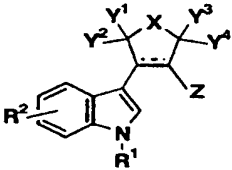
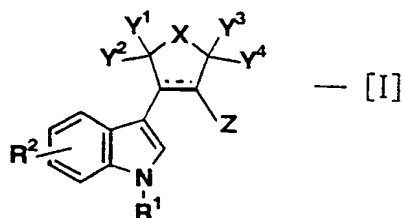




(51) 国際特許分類6 A61K 31/30 // C07D 403/04, 403/14, 405/04, 405/14, 471/04		A1	(11) 国際公開番号 WO99/42100
		(43) 国際公開日 1999年8月26日(26.08.99)	
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00772		(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 袖岡幹子(SODEOKA, Mikiko)[JP/JP] 〒228-0803 神奈川県相模原市相模大野8-10-4-502 Kanagawa, (JP)	
(22) 国際出願日 1999年2月22日(22.02.99)			
(30) 優先権データ 特願平10/40147 1998年2月23日(23.02.98) JP 特願平10/40148 1998年2月23日(23.02.98) JP 特願平10/162118 1998年6月10日(10.06.98) JP 特願平10/162119 1998年6月10日(10.06.98) JP		(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 藤田美歌子(FUJITA, Mikako)[JP/JP] 〒860-0811 熊本県熊本市本荘3-8-20-804-Kumamoto, (JP) 加藤美穂(KATOH, Miho)[JP/JP] 〒243-0414 神奈川県海老名市杉久保1723-16 Kanagawa, (JP)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 相模中央化学研究所 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER)[JP/JP] 〒229-0012 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号 Kanagawa, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
(71) 出願人 ; および (72) 発明者 朝海 伶(ASAKAI, Rei)[JP/JP] 〒330-0801 埼玉県大宮市土手町1丁目279-1 北大宮住宅1号棟403号 Saitama, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: CELL DEATH INHIBITORS			
(54)発明の名称 細胞死抑制剤			
			
(1)			
(57) Abstract Cell death inhibitors, drugs, preservatives for cells, tissues and organs, and assay systems of cell death inhibitors containing, as the active ingredient, indole derivatives represented by general formula [I] or pharmaceutically acceptable salts thereof which are expected as usable as preventives and remedies for the progress of various diseases wherein cell death participates in the progress and exacerbation thereof.			

本発明は、細胞死がその進行増悪に関っている種々の疾患の症状の進行の予防および治療薬として期待される、下記一般式[I]で表されるインドール誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする細胞死抑制剤、医薬、細胞、組織、臓器の保存剤、初代培養細胞を用いる細胞死抑制物質のアッセイ系を提供する。



PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストラリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア

ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア

LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン

SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィエトナム
YU ユーゴスラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明 細 書

細胞死抑制剤5 技術分野

本発明は、各種生体物質若しくは外来物質刺激、或いは温度、放射線等の刺激によって起こる細胞死を抑制しうる細胞死抑制剤、及びその神経変性疾患、循環器系疾患、肝炎、腎疾患、炎症性皮膚疾患、放射線障害、ウィルス性疾患、プリオン病又は臓器等の移植時の機能不全等の治療若しくは症状の進行の予防
10 の為の医薬としての用途、生体から取り出した臓器、組織、細胞の保存剤としての用途、並びに細胞死抑制物質を探索するためのアッセイ法に関する。

背景技術

近年の細胞死に関する研究の進展により、様々な病気の進行、増悪に、生体
15 にとって必須な細胞の細胞死、特にアポトーシスに関っていることが明らかとなってきた (Science, 267巻, 1456頁, 1995年)。アポトーシスとは、細胞が自らに備わる機構を用いて実行する細胞死であり、その一般的特徴としては(1)クロマチン凝集、(2)細胞縮小、(3)細胞膜のブレッピング(突起形成)、(4)核の断片化、(5)アポトーシス小体の形成、(6)DNAの断片化、(7)近隣の細胞やマ
20 クロファージによる貪食などが挙げられる。これに対し、過度の放射線、熱、あるいは刺激物質等により細胞が自らに備わる自死プログラムを実行する間も無く細胞の膨化および融解を起こし崩壊する細胞死がネクローシスと呼ばれている。しかし細胞の種類や置かれた環境、細胞死誘発刺激の種類や強度により細胞内機構が働いた結果の細胞死の場合でも必ずしも上記のアポトーシスの特徴の全てを示さない場合もある。また病理学的にネクローシスと呼ばれている
25 ものには、何らかの細胞内機構が働いた結果起こる細胞死も含まれている。本発明ではこのような細胞死もアポトーシスに含めるものとする。

アポトーシスによる細胞死がその進行増悪の原因となっている疾患としては、例えば、アルツハイマー病(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 168頁, 1996年)、脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy, SMA)(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 173頁, 1996年)、
5 筋萎縮性側索硬化症(ALS)(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 176頁, 1996年)、パーキンソン病(J. Neurochem., 69巻, 1612頁, 1997年)、ハンチントン病(J. Neurosci., 15巻, 3775頁, 1995年)、網膜色素変性症や緑内障(Bio Science 用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 196頁, 1996年)、小脳変性、新生児核黄疸などの神経変性疾患(Progress in
10 Drug Research, 48巻, 55頁, 1997年)、筋ジストロフィー(J. Clinical Investigation, 99巻, 2745頁, 1997年)、脳卒中等による脳虚血およびその後の遅発性神経細胞死(DND)(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 180, 182頁, 1996年)、心筋梗塞等による虚血性心疾患(心筋虚血と再灌流障害)、ウイルス性心筋炎、自己免疫性心筋炎(拡張型心筋症や慢性心筋炎等)、
15 肥大心および不全心にみられる心筋障害/細胞死、不整脈源性右室心筋症(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 198頁, 1996年、血管と内皮, 7巻, 357, 364, 370頁, 1997年)、アルコール性肝炎やウイルス性肝炎(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 190頁, 1996年)、糸球体腎炎や溶血性尿毒症症候群等の腎疾患(Bio Science用語
20 ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 192頁, 1996年)、後天性免疫不全症候群(AIDS)(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 156頁, 1996年、血液・免疫・腫瘍, 2巻, 432頁, 1997年)、中毒性表皮壊死融解(TEN)、多形滲出性紅斑などの炎症性皮膚疾患や脱毛症ならびに移植片宿主反応(GVH)(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 194頁,
25 1996年)、さらには放射線障害(Bio Science用語ライブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 160頁, 1996年)や抗癌剤や抗ウイルス薬等による副作用の他、アジ化ナトリウム、青酸カリウム等の毒性薬物による障害(Bio Science用語ラ

イブラリー:アポトーシス/実験医学別冊, 162頁, 1996年)、敗血症(Critical Care Medicine, 25巻, 1298頁, 1997年)、再生不良性貧血などの骨髓異形成症(Leukemia, 7巻, 144頁, 1993年)、インスリン依存性糖尿病(Diabetes, 44巻, 733頁, 1995年)、クロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病(J. Neural Transmission, Supplementum, 50巻, 191頁, 1997年)等があげられる。また、臓器移植においても、ドナーの心停止あるいは摘出により阻血状態におかれた臓器に移植後血液が再灌流する際におこる活性酸素や種々のケミカルメディエーターによる細胞のアポトーシスが移植臓器の機能不全の原因であることが示唆されている(例えば、移植, 27巻, 15頁, 1992年)。また、臓器、組織、細胞移植後の拒絶反応も宿主免疫細胞による攻撃により移植された細胞がアポトーシスを起こした結果ととらえることができる。従って細胞死を抑制する化合物はこれらの疾病の有効な治療または症状の進行、悪化を停止もしくは抑制する医薬となりうると考えられる。

臓器あるいは組織の移植においては、ドナーから摘出した臓器あるいは組織の保存状態が移植後の生着率の鍵を握る。従って細胞死を抑制する化合物をこれら臓器または組織保存液に添加することにより組織や臓器の保存性が向上すると期待される。また、生体から取り出してきた初代培養細胞は、癌細胞あるいは不死化した株化細胞と異なりその培養が困難なことが多い。これは長期培養のためにはそれぞれの細胞の種類に応じて培地に様々な成長因子などを適切な濃度で添加培養する必要がある、培養条件によっては容易にアポトーシスを起こしてしまうためである。従って研究あるいは医療目的で細胞を培養する場合に、細胞死を抑制する化合物を培養液に添加することにより、効率のよい培養を可能にすると期待される。

アポトーシスは、細胞の種類により様々な生理的な物質、例えばインターロイキンなどのサイトカインやグルコルチコイドなどのホルモン、グルタミン酸やNMDAなどの神経興奮性アミノ酸やFasリガンドに代表されるような膜蛋白質などで引き起こされることが知られており、また逆に細胞によっては特定の

成長因子などの欠損によっても引き起こされる。さらに種々の細胞に共通のアポトーシス誘発剤としては、過酸化水素などの活性酸素種発生剤、SNPなどのNO発生剤、熱、放射線などがあげられ、他にもアポトーシスの誘導活性をもつ化合物が数多く報告されている。最近の研究によると、その上流では多彩な情報伝達系がからむアポトーシスシグナルの伝達系も下流では一連のシステインプロテアーゼであるカスパーゼ活性化機構に収斂するらしいことが明らかになってきているが(Cell, 91巻, 443頁, 1997年)、その詳細な分子メカニズムの解明は今後の課題である。

アポトーシス抑制剤として現在までに知られているものとしては、細胞の種類に応じて各種成長因子や栄養因子、ホルモン等の生理的な抑制剤、N-アセチルシステインなどの抗酸化剤、カスパーゼ類の修飾ペプチド型の阻害剤などが知られている。この中で、一部のペプチド性の成長因子や神経栄養因子などが化学療法後の造血細胞回復や神経変性疾患や外傷による神経細胞死を防ぐ治療に用いられている例はあるものの(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90巻, 7951頁, 1993年, Nature, 367巻, 368頁, 1994年, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89巻, 11249頁, 1992年)、抗酸化剤やカスパーゼ類の阻害剤は細胞レベルの実験に用いられるにとどまっており、より生体内での安定性がより高く、経口投与可能な非ペプチド型低分子アポトーシス阻害剤の開発が望まれていた。また、実際の疾病で個々の細胞にアポトーシスを引き起こす生理的誘導因子や抑制因子などがすべて明らかになっている例は少なく、それらが未解明の疾病にも有効と考えられる全く新しいタイプの細胞死抑制剤、とくにアポトーシス抑制剤が求められていた。

一方、2-ハロ-3-インドリルマレイミド誘導体は、プロテインキナーゼC阻害活性をもつビスインドールマレイミド誘導体やインドロカルバゾール誘導体の合成中間体として様々な誘導体の合成が報告されていたが(例えばW095/30682, W097/34890, W097/09339, 特開平2-174778)、これらの誘導体が細胞死抑制作用を示すことについては一切報告がない。

また、ビスインドリルマレイミド誘導体は、プロテインキナーゼ、特にプロテインキナーゼC阻害活性があることが報告されており(例えば特開平2-306974、DE 3835842)、抗癌剤等としての用途は公知であるが、これらの誘導体が細胞死抑制作用を示すことについては一切報告がない。

5 さらに、現在臓器保存液としては一般にEuro-Collins液やUW液などが用いられており(移植, 27巻, 172頁, 1992年)、さらに上記の活性酸素障害を防ぐ目的で種々の抗酸化剤やラジカルスカベンジャーの添加が試みられ保存成績の向上が報告されている(例えば、移植, 27巻, 15頁, 1992年; 26巻, 62頁, 1991年; 25巻, 596頁, 1990年; Trans Proc, 17巻, 1454頁, 1985年)。しかしその
10 保存成績は必ずしも十分ではなく、より高い生着率が求められていた。

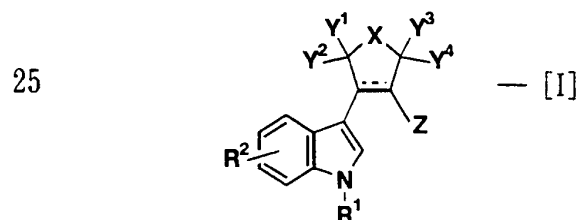
細胞死抑制剤のアッセイ法としては、現在培養の容易な癌細胞や不死化した株化細胞を用いて広範なスクリーニングが行われているが、これらの細胞はなんらかの形でそのアポトーシスの仕組みに異常をきたして不死化している場合がほとんどであり、正常細胞の細胞死を抑制する化合物が効果を示さない恐れ
15 があり、よりよい簡便なアッセイ法が求められていた。

発明の開示

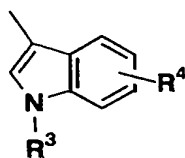
本発明の目的は、細胞死がその進行増悪に関っている種々の疾患の症状の進行の予防および治療薬として期待される、細胞死を抑制する有用な薬剤を提供
20 することにある。

本発明者らは、上記目的を達成せんと鋭意検討した結果、下記の誘導体が細胞死抑制作用を有することを見だし、本発明を完成させた。

すなわち本発明は、下記一般式[I]



(式中、Xは酸素原子またはN-R⁵を表し、Zはハロゲン原子または

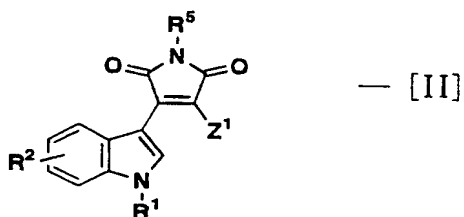


- 5 を表し、R¹, R³はそれぞれ独立に水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオカルボニル基、置換基を有していてもよいアミノカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいアルコキシル基もしくはアリールオキシ基、またはヒドロキシル基を表し、R², R⁴はそれぞれインドール環上の置換基を表し、置換基の数及び置換位置(インドール環の位置番号で2, 4, 5, 6あるいは7位)ならびに置換基の種類はそれぞれ
- 10 同じでも異なってもよく、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオカルボニル基、置換基を有していてもよいアミノカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいアルコキシル基もしくはアリールオキシ基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、シアノ基、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基、またはハロゲン原子を表し、R⁵は置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアルコキシル基もしくはアリールオキシ基、置
- 15
- 20
- 25

換基を有していてもよいアミノ基、ヒドロキシル基もしくは水素原子を表す。
Y¹とY²及びY³とY⁴はそれぞれ独立に、2個の水素原子あるいは水素原子とヒド
ロキシル基を表すか、または一体となってカルボニル基を表し、また、R¹とR²、
R¹とR³、R³とR⁴、またはR²とR⁴は一体となって置換基を有していてもよい炭化
5 水素鎖あるいはヘテロ原子を含む炭化水素鎖を形成していてもよい。式中、破
線をともなう結合は二重結合または単結合を表す。)で表されるインドール誘
導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする、細胞死抑制剤；
アルツハイマー病、脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy, SMA)、筋萎縮
性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、ハンチントン病、網膜色素変性症、緑
10 内障または小脳変性などの神経変性疾患に対する神経細胞死を抑制することによ
る症状の進行の予防または治療薬；新生児核黄疸に対する神経細胞死を抑制
することによる予防または治療薬；筋ジストロフィーに対する細胞死を抑制す
ることによる症状の進行の予防または治療薬；脳卒中等による脳虚血またはそ
の後の遅発性神経細胞死(DND)に対する神経細胞死を抑制することによる症状
15 の進行の予防または治療薬；心筋梗塞等による虚血性心疾患、ウイルス性心筋
炎、自己免疫性心筋炎、肥大心もしくは不全心にみられる心筋障害/細胞死ま
たは不整脈源性右室心筋症に対する心筋細胞死を抑制することによる症状の進
行の予防または治療薬；アルコール性肝炎もしくはウイルス性肝炎に対する肝
細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬；糸球体腎炎や
20 溶血性尿毒症症候群等の腎疾患に対する腎細胞の死を抑制することによる症状
の進行の予防または治療薬；後天性免疫不全症候群(AIDS)に対する過剰なT細
胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬；中毒性表皮壊死
融解(TEN)、多形滲出性紅斑などの炎症性皮膚疾患、脱毛症または移植片宿主
反応(GVH)に対する細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療
25 薬；放射線による障害もしくは抗癌剤や抗ウイルス薬などの薬剤による副作用
を含む種々の薬物による障害に対する細胞死を抑制することによる障害や副作
用の予防または治療薬；敗血症に対する細胞死を抑制することによる症状の進

行の予防または治療薬；再生不良性貧血などの骨髓異形成症に対する、骨髓由来細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬；インスリン依存性糖尿病に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬；プリオン病に対する神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬；臓器、組織または細胞移植時の移植臓器、組織または細胞の機能不全の予防または治療薬；臓器、組織および細胞の保存剤；並びに初代培養細胞に試験化合物の存在下に細胞死誘導刺激を加えるか若しくは細胞死誘導刺激を加えた直後に試験化合物を加え細胞の死滅割合を評価することを特徴とする細胞死抑制物質のアッセイ法を提供するものである。

さらに、本発明は、下記一般式[II]



(式中、Z¹はハロゲン原子を表し、R¹、R²とR⁵は前記と同じ意味を表す。)で表される2-ハロ-3-インドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容される塩を有効成分とする医薬を提供するものである。

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

発明を実施するための最良の形態

本発明に係るインドール誘導体は、参考例に示した方法によって合成することができる他、市販されているか(CALBIOCHEM社；LC Laboratory社等)、または公知の方法(例えば、Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年；J. Biol. Chem., 266巻, 15771頁, 1991年；J. Med. Chem., 35巻, 177頁, 994頁, 1992年；J. Med. Chem., 36巻, 21頁, 1993年)もしくはその類似の方法により合成することができる。

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキル基」におけるアルキル基とは、直鎖状、分岐状、環状いずれでもよく、例えば炭素数1～30のアルキル

基、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、14-メチルペンタデシル基、6-メチルペンタデシル基、オクタデシル基、イコシル基、テトラコシル基などがあげられる。

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルケニル基」におけるアルケニル基とは、直鎖状、分岐状、環状いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアルケニル基、具体的にはアリル基、ビニル基、クロチル基、1-ペンテン-1-イル基、2-ペンテン-1-イル基、3-ペンテン-1-イル基、1-ヘキセン-1-イル基、2-ヘキセン-1-イル基、3-ヘキセン-1-イル基、2-シクロヘキセニル基、2-シクロペンテニル基、8-ヘプタデセン-1-イル基、8,11-ヘプタデカジエン-1-イル基、8,11,14-ヘプタデカトリエン-1-イル基、4,7,10,13-ノナデカテトラエン-1-イル基、9-オクタデセン-1-イル基、9,12-オクタデカジエン-1-イル基、9,12,15-オクタデカトリエン-1-イル基、6,9,12-オクタデカトリエン-1-イル基、5,8,11,14-イコサテトラエン-1-イル基、5,8,11,14,17-イコサペンタエン-1-イル基、4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン-1-イル基などがあげられる。

本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキニル基」におけるアルキニル基とは、直鎖状、分岐状、環状いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアルキニル基、具体的にはエチニル基、プロパルギル基、1-ペンチン-1-イル基、2-ペンチン-1-イル基、3-ペンチン-1-イル基、1-オクチン-1-イル基、8-ヘプタデシン-1-イル基などがあげられる。

本明細書中、「置換基を有していてもよいアリール基」におけるアリール基とは、ヘテロアリール基をも包含し、例えばフェニル基、ナフチル基、アンスラニル基、ピレニル基、ビフェニル基、4-ピリジル基、2-ピリジル基、ピリミジニル基、ピラジニル基、ピリダニジル基、ピペラジニル基、ピラゾリル基、イ

ミダゾリル基、キニリル基、ピロリル基、インドリル基、フリル基などがあげられる。

5 本明細書中、「置換基を有していてもよいアシル基」におけるアシル基とは、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアシル基、具体的にはアセチル基、プロピオニル基、イソプロピオニル基、ピバロイル基、オレオイル基、シクロヘキシルカルボニル基、アクロイル基、クロトノイル基、ベンゾイル基、ナフトイル基、ニコチノイル基などがあげられる。

10 本明細書中、「置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリーロキシカルボニル基」におけるアルコキシもしくはアリーロキシカルボニル基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでも良く、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、イソプロピルオキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基、s-ブトキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、シクロペンチルオキシカルボニル基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、アリルオキシカルボニル基、フェニルオキシカルボニル基、ピリジルオキシカルボニル基などの基があげられる。

20 本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリーロチオカルボニル基」におけるアルキルもしくはアリーロチオカルボニル基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでも良く、例えばメチルチオカルボニル基、エチルチオカルボニル基、プロピルチオカルボニル基、イソプロピルチオカルボニル基、ブチルチオカルボニル基、t-ブチルチオカルボニル基、シクロペンチルオキシチオカルボニル基、シクロヘキシルオキシチオカルボニル基、ベンジルチオカルボニル基、フェニルチオカルボニル基、ピリジルチオカルボニル基などの基があげられる。

25 本明細書中、「置換基を有していてもよいアミノカルボニル基」は、無置換カルバモイル基、あるいは置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有し

ていてもよい芳香族基、水酸基、置換基を有していてもよいアルコキシル基、置換基を有していてもよいアミノ基などで置換されたカルバモイル基を示し、例えばカルバモイル基、エチルアミノカルボニル基、プロピルアミノカルボニル基、イソプロピルアミノカルボニル基、ブチルアミノカルボニル基、*t*-ブチルアミノカルボニル基、シクロペンチルアミノカルボニル基、シクロヘキシルアミノカルボニル基、ベンジルアミノカルボニル基、フェニルアミノカルボニル基、ピリジルアミノカルボニル基、ベンジルオキシアミノカルボニル基などの基があげられる。

10 本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリアルスルホニル基」におけるアルキルもしくはアリアルスルホニル基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでも良く、例えばメタンスルホニル基、エタンスルホニル基、ベンゼンスルホニル基、シクロヘキサンスルホニル基、ナフタレンスルホニル基などの基があげられる。

15 本明細書中、「置換基を有していてもよいアルコキシル基もしくはアリアルオキシ基」における、アルコキシル基もしくはアリアルオキシ基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアルコキシル基もしくはアリアルオキシ基、具体的にはメトキシ基、エトキシ基、プロピルオキシ基、*t*-ブトキシ基、アリルオキシ基、シクロペンチルオキシ基、シクロヘキシルオキシ基、ベンジルオキシ基、フェノキシ基などがあげられる。

20 本明細書中、「置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリアルチオ基」における、アルキルもしくはアリアルチオ基は、直鎖状、分岐状、環状、飽和、不飽和の脂肪族、あるいは芳香族いずれでもよく、例えば炭素数2～30のアルキルもしくはアリアルチオ基、具体的にはメチルチオ基、エチルチオ基、プロピルチオ基、*t*-ブチルチオ基、アリルチオ基、シクロペンチルチオ基、シクロヘキシルチオ基、ベンジルチオ基、フェニルチオ基などがあげられる。

本明細書中、「置換基を有していてもよいアミノ基」は、無置換アミノ基、あ

るいはアルキル基、芳香族基などで置換されたアミノ基を示し、例えばエチルアミノ基、プロピルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ブチルアミノ基、*t*-ブチルアミノ基、ベンジルアミノ基、フェニルアミノ基、ピリジルアミノ基、ピペラジニル基、インドリニル基などの基があげられる。

- 5 本明細書中、「ハロゲン原子」はフッ素原子、塩素原子、臭素原子およびヨウ素原子があげられる。

- 10 上記アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルキルチオカルボニル基、アリールチオカルボニル基、アミノカルボニル基、アルコキシル基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基等が有していてもよい置換基としては、例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルキルチオカルボニル基、アリールチオカルボニル基、アミノカルボニル基、アルコキシル基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基をあげ
- 15 ることができ、これらの具体例は前記と同様である。その他の置換基としては、アミノ基、ハロゲン基、ニトロ基、アミノ基(アシル基、アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、カルバモイル基、置換スルホニル基、アルキル基、シクロアルキル基、アリール基等を置換基として有していてもよい)、シアノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基などの基の他、ベンジル基、
- 20 フェネチル基、ナフチルメチル基等のアラルキル基があげられる。

- 25 医薬として許容されうる塩としては、酸部位を有する化合物については無機塩基または有機塩基との塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩、エタノールアミン塩、リジン塩、アルギニン塩、キノリン塩、ピリジン塩等の脂肪族または複素環芳香族アミン塩、テトラメチルアンモニウム塩等の四級アンモニウム塩など、あるいは塩基部位を有する化合物については、無機酸または有機酸との塩、例えば塩酸塩、臭素酸塩、ヨウ素

酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸、乳酸塩、サリチル酸塩、マロン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、シュウ酸、アスコルビン酸塩等が挙げられる。

5 本発明に係る化合物を医薬として使用する際の投与形態としては各種の形態を選択でき、例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤もしくは液剤等の経口剤、注射剤、直腸投与剤、皮膚外用剤、吸入剤などの非経口投与剤等が挙げられる。

10 固体の製剤は、そのまま錠剤、カプセル剤、顆粒剤または粉末の形態として製造することもできるが、適当な添加物を使用して製造することもできる。そのような添加物としては、例えば乳糖もしくはブドウ糖等の糖類、澱粉類、例えばステアリン酸等の脂肪酸、例えばメタケイ酸アルミン酸マグネシウムもしくは無水リン酸カルシウム等の無機塩、例えばポリビニルピロリドンもしくはポリアルキレングリコールなどの合成高分子、例えばステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸マグネシウム等の脂肪酸塩、例えばステアリルアルコールもしくはベンジルアルコール等のアルコール類、例えばメチルセルロース、
15 エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース等の合成セルロース誘導体、その他、水、ゼラチン、タルク、植物油、アラビアゴム等通常用いられる添加物が挙げられる。

20 液状製剤は、水、アルコール類または例えば大豆油、ピーナッツ油もしくはゴマ油等の植物由来の油等液状製剤において通常用いられる適当な添加物を使用し、懸濁液、シロップ剤もしくは注射剤等の形態として製造される。

特に、注射剤として投与する場合の適当な溶剤としては、例えば注射用蒸留水、塩酸リドカイン水溶液、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、エタノール、静脈内注射用液体(例えばクエン酸及びクエン酸ナトリウム等の水溶液)、電解質溶液等、またはこれらの混合溶液が挙げられる。これらの注射剤は予め溶解したもの
25 の他、粉末のまま或いは適当な添加物を加えたものを用时溶解する形態もとる。

直腸投与剤を製造するには、活性成分及びカカオ脂、脂肪酸のトリ、ジおよ

びモノグリセリド、ポリエチレングリコールなどの坐剤用基剤とを加温して溶解し型に流し込んで冷却するか、活性成分をポリエチレングリコール、大豆油などに溶解した後ゼラチン膜で被覆すればよい。

5 皮膚外用剤を製造するには、活性成分をワセリン、ミツロウ、流動パラフィン、ポリエチレングリコールなどに加えて、必要ならば加温して練合し軟膏剤とするか、ロジン、アクリル酸アルキルエステル重合体などの粘着剤と練合した後、ポリエチレンなどの不織布に展延してテープ剤とする。

吸入剤を製造するには、活性成分をフロンガスなどの噴射剤に溶解または分散して耐圧容器に充填しエアロゾール剤とする。

10 本発明の化合物の実際に好ましい投与量は、配合された組成物の種類、適用頻度及び治療すべき疾病、さらに患者の年齢、体重、病態によって異なるが、通常1日約1～1000mg、好ましくは5～500mgであり、1回ないし数回にわけて投与することが望ましい。

15 本発明に係る臓器としてはあらゆる臓器が含まれ、例えば心臓、肺、肝臓、腎臓、すい臓、腸などがあげられる。

本発明に係る組織としてはあらゆる組織が含まれ、例えば皮膚、角膜、骨髓、血管、骨などがあげられる。

20 本発明において、移植による細胞の機能維持もしくはその保存への効果が期待される細胞としてはすべての細胞(正常な各種細胞、不死化した株化細胞、癌化した細胞や、治療あるいは研究目的で遺伝子工学的に修飾した細胞など)が含まれ、例えば血球系細胞、脾ランゲルハンス島細胞、上皮系細胞、神経系細胞、胚性幹細胞などがあげられる。

25 また、本発明に係る化合物を臓器、組織、または細胞の保存剤として使用する際の投与形態としては各種の形態を選択でき、例えば適当な塩類や栄養素などを含む培養液や保存液に本化合物もしくはその医薬として許容されうる塩を添加することができるほか、臓器移植の場合は臓器摘出前のドナーに体内灌流、静脈内投与などで投与することもできる。

本発明のアッセイ法で使用する初代培養細胞としては、動物より単離し培養するあらゆる細胞が含まれ、例えば神経細胞、肝細胞、腎細胞、皮膚細胞、
5 心筋細胞、血管細胞、白血球や赤血球などの血球系細胞、卵巣細胞などがあげられ、特に種々のアポトーシス刺激に反応して高度に同調的な細胞死が光学顕微鏡で容易に観察されることなどから、卵巣顆粒膜細胞が好ましい。

本発明のアッセイ法で使用するアポトーシス誘導刺激としては、初代培養細胞にアポトーシスを誘導するあらゆる刺激が含まれ、例えば血清や各種成長因子やホルモンの欠損、グルココルチコイドなどのホルモン類、プロスタグランジンなどの局所ケミカルメディエーター類、TNFなどのサイトカイン類、
10 グルタミン酸、ビリルビンのような生理的物質、あるいはFas抗体、過酸化水素などの活性酸素種発生試薬、SNPなどのNO発生試薬、エトポシドなどの抗がん剤、スタウロスポリン(例えば、J. Cell Biol. 133巻, 1053頁, 1996年)その他の各種細胞毒性薬剤等の添加、さらに放射線、熱などの物理的刺激などがあげられる。

15 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではないことはいうまでもない。

実施例

20 試験例 1

卵巣顆粒膜細胞(Porcine Ovarian Granulosa Cells, POGC)は公知の方法(Endocrinology, 136巻, 3470頁, 1995年)に従い、ブタ卵巣より分離培養した。すなわちブタ卵巣をPBSバッファーで洗浄し、シリンジを用いて卵胞からPOGCを吸引採取する。この懸濁液を遠心分離して細胞分画を沈殿として回収し、さらに
25 この細胞分画をPBSに再懸濁し再び遠心分離する操作を3回くりかえし細胞を洗浄する。沈殿として得られたPOGCを培地(10%仔牛血清を含むDMEM)で再懸濁し、さらにピペッティング操作で細胞塊を崩す。この細胞懸濁液をメッシュを通し

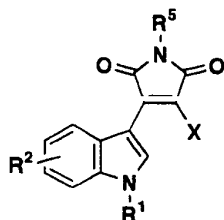
て混入した組織片等を取り除き、24穴細胞培養用ディッシュにまく。定法に従い(37°C, 5% CO₂)2日間CO₂インキュベーターで培養したのち、浮遊細胞を除く為に培地を交換し、細胞がサブコンフルエント(0.7~2x10⁵細胞/well)になるまでさらに2-3日培養する。付着細胞を血清を含まない培地で洗浄後、血清を
5 含まないDMEM培地(5 µg/mLトランスフェリン, 40ng/mLヒドロコルチゾン, 4mg/mLウシ血清アルブミン(BSA), 100nMアンドロステンジオンを含む)で培養した。このPOGCに、NO発生試薬として知られるSNP(ニトロプルシドナトリウム, Na₂[Fe(CN)₅NO], 0.5 mM)を加えると6時間後の観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により
10 観察され、またMTT試験によってもその細胞死を確認した。そこで本培養系の培地中に、様々な濃度の試験化合物を加え、48時間後に細胞を観察した。その結果、アポトーシスを完全に抑制した各化合物の最小有効濃度を表1に示す。

表1 ブタ卵巣顆粒膜細胞のSNP刺激によるアポトーシスの抑制効果

化合物	最小有効濃度 (µM)	化合物	最小有効濃度 (µM)
化合物1*	15	化合物6	3
化合物2	10	化合物7	7
化合物3	3	化合物8	7
化合物4	10	化合物9*	15
化合物5	15	化合物10**	3

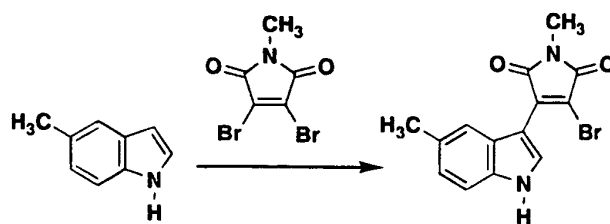
*SNP処理後18時間で判定、**同35時間で判定

表2 試験化合物の一覧-1



化合物番号	X	R¹	R²	R⁵
1	Br	H	H	CH₃
2	Br	COOᵗBu	H	CH₃
3	Br	H	5-CH₃	CH₃
4	Br	H	7-CH₃	CH₃
5	Br	H	5-Cl	CH₃
6	Br	COOᵗBu	5-CH₃	CH₃
7	Br	COOᵗBu	7-CH₃	CH₃
8	Br	COOᵗBu	5-Cl	CH₃
9	Br	CH₃	H	CH₃
10	Br	(CH₂)₆CH₃	H	CH₃

参考例1



5-メチルインドール(150mg, 1.15mmol)をTHF(3mL)に溶かした溶液に40℃にて0.96M臭化エチルマグネシウム(1.20mL, 1.15mmol)を加え、40℃にて30分間撹拌した。反応液を室温まで冷却し、公知の方法(Chem. Ber., 764頁, 1964年)に従って合成した2,3-ジブromo-N-メチルマレイミド(155mg, 0.575mmol)をTHF(5mL)に溶かした溶液を加え、室温にて一晩撹拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水

溶液(0.5mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりTHFを留去し、濃縮液からジクロロメタンで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:10~1:3)によって精製し、化合物3(185mg, quant)を褐色固体として得た。

5 mp 158-159 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.51 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 7.13 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.33 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.96 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H), 8.66 (brs, 1H).

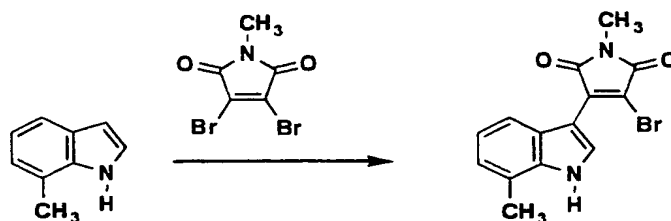
IR(KBr) 3360, 1690, 1590, 1420, 1370, 1150, 1090, 800, 730, 600 cm^{-1}

MS m/z 318 (M^+)

10

参考例 2

15



20

7-メチルインドール(153mg, 1.17mmol)をTHF(3mL)に溶かした溶液に、40°Cにて0.96M臭化エチルマグネシウム(1.22mL, 1.17mmol)を加え、40°Cにて30分間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(158mg, 0.588mmol)をTHF(5mL)に溶かした溶液を加え、室温にて2時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(0.5mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりTHFを留去し、濃縮液からジクロロメタンで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:10~1:3)によって精製し、化合物4(171mg, 91%)を赤色固体として得た。

25

mp 153-156°C

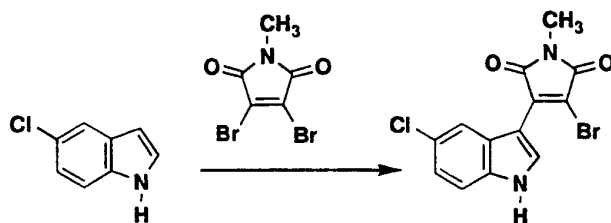
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.54 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 7.1-7.2 (m, 2H), 7.88 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.99 (d, $J=5.0\text{Hz}$, 1H), 8.69 (brs, 1H).

IR (KBr) 3320, 1690, 1430, 1380, 1150 cm^{-1}

MS m/z 318 (M^+)

参考例 3

5



10

5-クロロインドール(153mg, 1.01mmol)をTHF(3mL)に溶かした溶液に、40℃にて0.96M臭化エチルマグネシウム(1.05mL, 1.01mmol)を加え、40℃にて30分間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(136mg, 0.505mmol)をTHF(5mL)に溶かした溶液を加え、室温にて2時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(0.5mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりTHFを留去し、濃縮液からジクロロメタンで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:10~1:3)によって精製し、化合物5(146mg, 85%)を淡褐色固体として得た。

15

mp 227-229℃(decomp.)

20

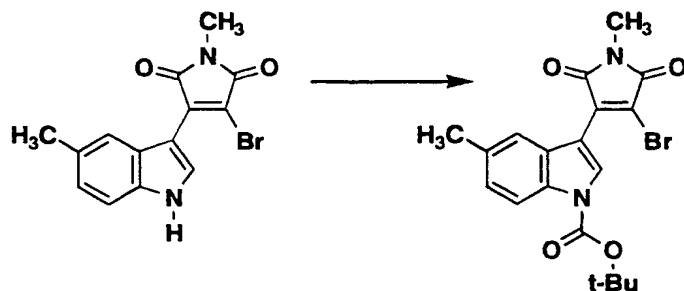
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.18(s, 3H), 7.2-7.3(m, 1H), 7.38(d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 8.0-8.1(m, 2H), 8.78(brs, 1H).

IR(KBr) 3350, 1690, 1600, 1410, 1370, 610 cm^{-1}

MS m/z 338 (M^+)

25

参考例 4



5

10

化合物 3 (118mg, 0.370mmol) を THF (5mL) に溶かした溶液に、4℃にてジ-tert-ブチルジカーボネート (97mg, 0.44mmol) とジメチルアミノピリジン (2.3mg, 0.019mmol) を加え、4℃にて1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン=1:10) によって精製して、化合物 6 (75mg, 48%) を黄色固体として得た。

mp 76-79℃

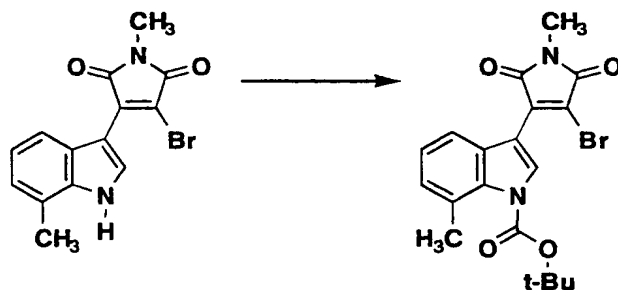
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.69 (s, 9H), 2.47 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 7.21 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.60 (s, 1H), 8.08 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 8.14 (s, 1H).

15

IR (KBr) 1700, 1430, 1360, 1240, 1140, 1060 cm^{-1}

MS m/z 418 (M^+)

参考例 5



20

25

化合物 4 (100mg, 0.313mmol) を THF (4mL) に溶かした溶液に、4℃にてジ-tert-ブチルジカーボネート (82mg, 0.38mmol) とジメチルアミノピリジン (1.9mg, 0.016mmol) を加え、4℃にて1時間攪拌、さらに室温にて1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキ

サン=1:10~1:1)によって精製して、化合物7 (139mg, quant)を黄色固体として得た。

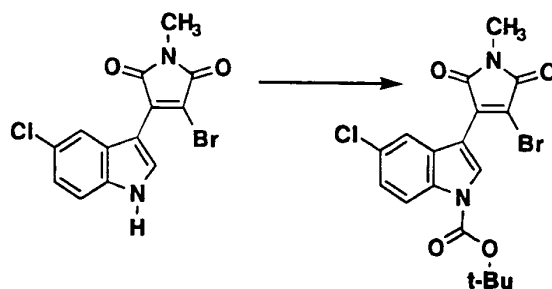
mp 54-57°C

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.67 (s, 9H), 2.66 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 7.1-7.3 (m, 2H), 7.59 (m, 1H), 8.05 (s, 1H).

IR (KBr) 2960, 1710, 1610, 1430, 1380, 1210, 1140, 1040, 850, 740 cm⁻¹

MS m/z 418 (M⁺)

参考例6



化合物5 (88mg, 0.259mmol)をTHF (3.5mL)に溶かした溶液に、4°Cにてジ-tert-ブチルジカーボネート (68mg, 0.31mmol)とジメチルアミノピリジン (1.6mg, 0.013mmol)を加え、4°Cにて1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン=1:10)によって精製して、化合物8 (89mg, 78%)を黄色固体として得た。

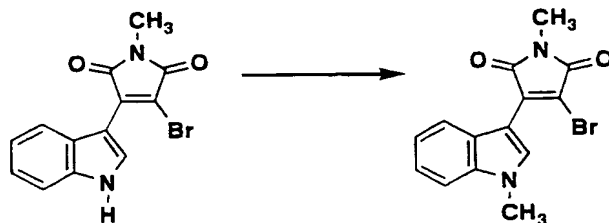
mp 155-157°C

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.72 (s, 9H), 3.20 (s, 3H), 7.36 (dd, J=1.2, 8.4Hz, 1H), 7.83 (d, J=1.2Hz, 1H), 8.14 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.21 (s, 1H).

IR (KBr) 1700, 1510, 1440, 1360, 1260, 1230, 1200, 1140, 1060, 1000, 820, 750, 700 cm⁻¹

MS m/z 438 (M⁺)

参考例 7



5

公知の方法により合成した化合物 1 (100mg, 0.327mmol) をアセトン (10mL) に溶かした溶液に、炭酸カリウム (49.8mg, 0.360mmol)、次いでジメチル硫酸 (0.04mL, 0.43mmol) を加え、加熱還流下、一晩撹拌した。反応液に水 (5mL) を加え、減圧濃縮によりアセトンを留去した。濃縮液からジクロロメタンで抽出した後、抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン=1:10~1:3) によって精製し、化合物 9 (89mg, 85%) を淡褐色固体として得た。

10

mp 155-158 °C

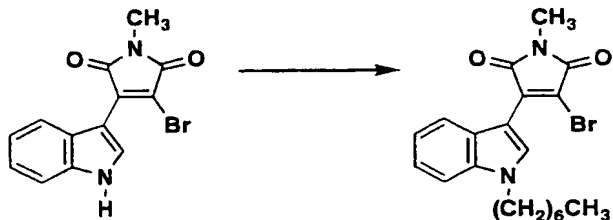
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.17 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 7.2-7.4 (m, 3H), 7.90 (s, 1H), 8.06 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H).

15

IR (KBr) 1770, 1700, 1580, 1510, 1430, 1370, 1230, 1150, 1120, 980, 800, 730 cm^{-1}

MS m/z 318 (M^+)

参考例 8



20

DMF (0.5mL) に懸濁した水素化ナトリウム (油性, 60-72%, 34mg) に、公知の方法により合成した化合物 1 (130mg, 0.425mmol) の DMF 溶液 (2mL) を加え、室温で 30 分間撹拌した。この混合物に臭化 n-ヘプチル (0.60mL, 4.3mmol) を加え、40°C で 1.5 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して DMF を留去した後、水 (50mL) を加え、

25

ジクロロメタン(200mL x 2)酢酸エチル(100mL x 1)により抽出した。有機層を合わせ、水洗(50mL x 2)後、硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:10~1:1)によって精製し、化合物10(39mg, 23%)を褐色油状物質として得た。

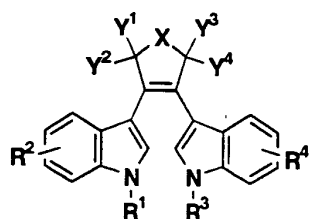
5 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0.8-2.0 (m, 13H), 3.16 (s, 3H), 4.20 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 7.2-7.5 (m, 3H), 7.95 (s, 1H), 8.08 (m, 1H).

IR (KBr) 2950, 2880, 1770, 1710, 1620, 1510, 1440, 1390, 1210, 1180, 1130, 1020, 980, 840, 810, 740 cm^{-1}

MS m/z 402 (M^+)

10

表3 試験化合物の一覧 2-1



15

化合物番号	Y ¹	Y ²	Y ³	Y ⁴	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
11	0		0		0	H	H	H	H
12	0		0		NOH	H	H	H	H
13	0		0		NH	H	H	H	H
14	0		0		NCH ₃	H	H	H	H
15	0		0		NCH ₂ CH ₂ CH ₃	H	H	H	H
16	0		OH	H	NCH ₃	H	H	H	H
17	0		0		NH	(CH ₂) ₃ NH ₂	H	H	H
18	0		0		NH	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	H	H	H
19	0		0		NCH ₃	(CH ₂) ₃ NH ₂	H	H	H
20	0		0		NCH ₃	(CH ₂) ₃ NHCOCH ₃	H	H	H
21	0		0		NCH ₃	(CH ₂) ₃ NHCOPh	H	H	H

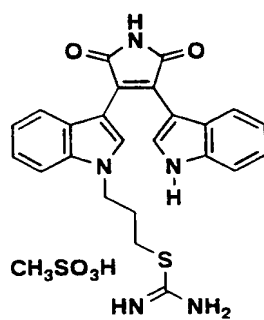
25

試験化合物の一覧 2-1 (続き)

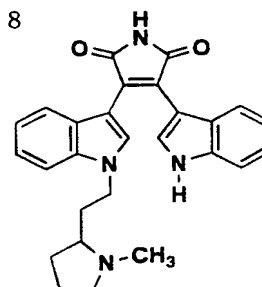
化合物 番号	Y ¹	Y ²	Y ³	Y ⁴	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
22	0		0		NCH ₃	COO ^t Bu	H	H	H
23	0		0		NCH ₃	COO ^t Bu	H	COO ^t Bu	H
24	0		0		NCH ₃	H	H	H	5-Cl
25	0		0		NCH ₃	H	7-CH ₃	H	7-CH ₃
26	0		0		NH	(CH ₂) ₃ NH ₂	H	CH ₃	H

表4 試験化合物の一覧 2-2

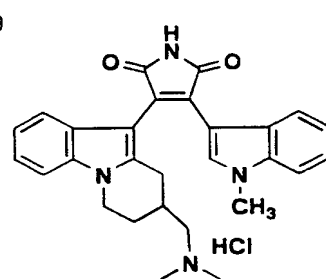
化合物 27



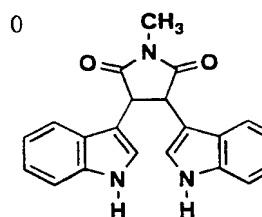
化合物 28



化合物 29



化合物 30



10

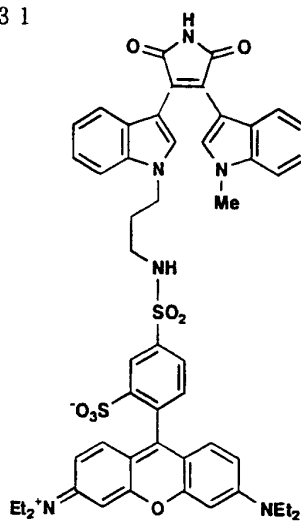
15

20

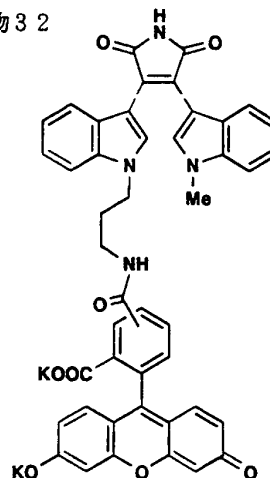
25

試験化合物の一覧 2-2 (続き)

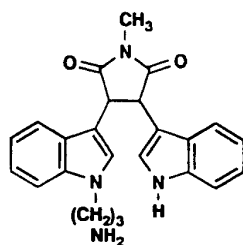
化合物 3 1



化合物 3 2



化合物 3 3



化合物 3 4

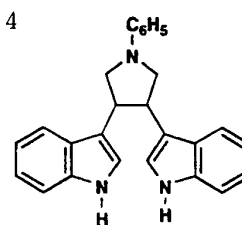
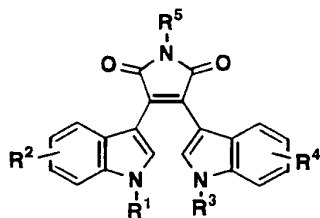


表5 試験化合物の一覧 2-3



化合物番号	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
3 5	CH ₃	H	H	H	CH ₃
3 6	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃
3 7	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	H	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	H	CH ₃
3 8	H	6-CH ₃	H	6-CH ₃	CH ₃
3 9	H	7-CH ₃	H	H	CH ₃
4 0	H	5-CH ₃	H	5-CH ₃	CH ₃

試験化合物の一覧 2-3 (続き)

化合物番号	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
4 1	H	5-F	H	5-F	CH ₃
4 2	H	5-Br	H	5-Br	CH ₃
4 3	H	H	H	5-Cl	CH ₃
4 4	H	5-OCH ₃	H	5-OCH ₃	CH ₃
4 5	H	4-OCH ₃	H	4-OCH ₃	CH ₃
4 6	H	2-CH ₃	H	H	CH ₃
4 7	H	2-CH ₃	H	2-CH ₃	CH ₃
4 8	H	H	H	H	C ₆ H ₅
4 9	H	H	H	H	CH ₂ C ₆ H ₅

試験例 2

卵巣顆粒膜細胞は卵胞中で卵細胞をとり囲む細胞で、性周期にあわせて卵胞刺激ホルモン (FSH) 並びに黄体化ホルモン (LH) により増殖分化し、プロゲステロンの生産分泌能を獲得する。排卵しない卵胞は最終的にアポトーシスをおこして消滅する。この分化のプロセスは公知の方法 (Endocrinology, 136巻, 3470頁, 1995年) に従い、以下の *in vitro* の実験によって再現することが出来る。

さらに以下に記すように最終分化能を維持したまま培養を続けるとアポトーシスをおこす。すなわちブタ卵巣をPBSバッファーで洗浄し、シリンジを用いて卵胞からブタ卵巣顆粒膜細胞 (Porcine Ovarian Granulosa Cells, POGC) を吸引採取する。この懸濁液を遠心分離して細胞分画を沈殿として回収し、さらにこの細胞分画をPBSに再懸濁し再び遠心分離する操作を3回くりかえし細胞を洗浄する。沈殿として得られたPOGCを培地 (10% 仔牛血清を含むDMEM) で再懸濁し、さらにピペティング操作で細胞塊を崩す。この細胞懸濁液をメッシュを通して混入した組織片等を取り除き、24穴細胞培養用ディッシュにまく。定法に従い (37°C, 5% CO₂) 2日間CO₂ インキュベーターで培養したのち、浮遊細胞を除く

5 為に培地を交換し、細胞がサブコンフルエント ($0.7 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/well) になる
までさらに2-3日培養する。付着細胞を血清を含まない培地で洗浄後、血清を
含まないFSHとLHを添加した培地 ($5 \mu\text{g/mL}$ トランスフェリン, 40ng/mL ハイドロ
10 コルチゾン, 4mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA), 100nM アンドロステンジオンおよ
び 100ng/mL FSH, 10ng/mL LHを含む) でさらに3日間培養し、さらに培地 (上記と
同じ組成) を替えて培養を続けると形態は線維芽細胞様から上皮細胞様に変化
し、ホルモン産生能も活発化して完全に分化状態に移行する。この分化した細
胞はさらに培養を続けると、約5日後に同調的に死滅することがトリパンプル
15 ーの排除テストならびにMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltet
razolium bromide) 試験によって示された。この細胞死がアポトーシスに特徴
的な形態変化を示すことが光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により観察された。本
培養系の培地中に、最終的な培地交換後4日目の時点で $3 \mu\text{M}$ の濃度で試験化合
物 18 を加えたところ、試験化合物を加えた後7日後の観察でも95%以上の細
胞が生存していた。

15

試験例 3

試験例 2 に述べた方法で完全に分化させた細胞に、最終培地交換後2日でプ
ロスタグランジン $\text{F}_2\alpha$ ($\text{PGF}_2\alpha$) ($50 \mu\text{g/mL}$) を加えると、16時間後の観察で細
胞はアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡ならび
20 に電子顕微鏡により観察された。この培地に $\text{PGF}_2\alpha$ 添加前に試験化合物 18 (3
 μM) を加え、同条件で培養を続けると細胞死が抑制され、16時間後の観察で95
%以上の細胞が生存していた。

試験例 4

25 試験例 2 と同様な方法で単離培養しサブコンフルエントに達したPOGCを、無
血清培地で洗浄後、血清およびFSHとLHを含まない培地 ($5 \mu\text{g/mL}$ トランスフェ
リン, 40ng/mL ハイドロコルチゾン, 4mg/mL BSA, 100nM アンドロステンジオンを

含む)で培養する(ホルモン刺激を行わない)と、細胞はFSHとLHを加えた細胞(試験例2)に比べると比較的未分化のまま培養を続けることができるが、この無血清培地では長期間(2~3週間)培養すると、やはりアポトーシスに特徴的な形態変化を示し死滅する事が光学顕微鏡により観察された。この細胞死は非同調的に少しずつおこり、約1週間かかってすべての細胞が死滅した。しかし本培養系の培地中に、試験化合物18(3 μ M)を加えたところ細胞死が抑制され、試験化合物を加えない細胞が死滅して7日後の観察でも95%以上の細胞が生存していた。

10 試験例5

試験例2と同様な方法で単離培養しサブコンフルエントに達したPOGCを、無血清培地で洗浄後、試験例2と同様に血清およびFSHとLHを含む培地(5 μ g/mL トランスフェリン, 40ng/mL ハイドロコルチゾン, 4mg/mL BSA, 100nM アンドロステンジオンおよび100ng/mL FSH, 10ng/mL LHを含む)で培養を続けた完全に分化した細胞にスタウロスポリン(3nM)を加えると、44時間後の観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡により観察された。この培地にスタウロスポリン添加前に試験化合物18(3 μ M)を加え、同条件で培養を続けると細胞死が抑制され、68時間後の観察でも95%以上の細胞が生存していた。

20

試験例6

試験例4と同様な方法で培養した未分化POGCに、過酸化水素(100 μ M)を加えると、12時間後の観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡により観察された。この培地に過酸化水素添加前に試験化合物18(3 μ M)を加え、同条件で培養を続けると、24時間後の観察でも細胞死が完全に抑制され、95%以上の細胞が生存していた。

25

試験例 7

試験例 4 と同様な方法で培養した未分化POGCに、NO発生試薬として知られる
 SNP(ニトロプルシドナトリウム, Na₂[Fe(CN)₅NO], 0.5mM)を加えると6時間後の
 観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事
 5 が光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により観察され、またMTT試験によってもその
 細胞死を確認した。そこで本培養系の培地中に、様々な濃度の試験化合物を加
 え、48時間後に細胞を観察した。その結果、アポトーシスを完全に抑制した各
 化合物の最小有効濃度を表 6 に示す。

10 表 6 ブタ卵巣顆粒膜細胞のSNP刺激によるアポトーシスの抑制効果

	化合物	最小有効濃度 (μ M)	化合物	最小有効濃度 (μ M)
15	化合物 1 1 *	10	化合物 3 1 *	3
	化合物 1 2	15	化合物 3 2	3
	化合物 1 3	5	化合物 3 3 **	10
	化合物 1 4	5	化合物 3 4 **	0.3
	化合物 1 5	3	化合物 3 5 **	10
	化合物 1 6	5	化合物 3 6 **	10
	化合物 1 7 *	3	化合物 3 7 **	10
	化合物 1 8	0.7	化合物 3 8 **	0.3
	化合物 1 9	0.7	化合物 3 9 **	3
	化合物 2 0	7	化合物 4 0 **	1
	化合物 2 1	7	化合物 4 1 **	10
	化合物 2 2	5	化合物 4 2 **	1
	化合物 2 3	5	化合物 4 3 **	3
	化合物 2 4	3	化合物 4 4 **	1
	化合物 2 5	0.3	化合物 4 5 **	3
20	化合物 2 6	1	化合物 4 6 **	10
	化合物 2 7	1	化合物 4 7 **	10
	化合物 2 8 **	3	化合物 4 8 **	1
	化合物 2 9 **	1	化合物 4 9 **	1
	化合物 3 0	10		

*SNP処理後30時間で判定、**同18時間で判定

25

比較例 1

試験例 7 と同様な方法でサイクリン依存性キナーゼの阻害剤として公知のオ
 ロムシン(olomoucine, CALBIOCHEM社より購入)のアポトーシス抑制作用を調べ

た。その結果、30 μ Mの濃度においても全くアポトーシス抑制作用を示さなかった。

試験例 8

試験例 4 と同様な方法で培養した未分化POGCに、ビリルビン(30 μ g/mL)を添加すると2日後の観察で50%、3日後の観察で95%の細胞が死ぬ事が光学顕微鏡により観察され、またトリパンプルー排除試験、MTT試験によってもその細胞死を確認した。この培地にビリルビン添加前に試験化合物 1 4 (10 μ M)または試験化合物 2 5 (10 μ M)を加え、同条件で培養を続けると細胞死が抑制され、4日後の観察でもそれぞれ50%、95%の細胞が生存していた。

10

試験例 9

マウス顆粒膜細胞にSV40のT抗原とステロイドジェニックファクター-1 (SF-1/Ad4BP) のcDNAを感染させて4B2という細胞株を樹立した。この細胞はプロテインキナーゼA依存性にプロゲステロンを分泌する。この4B2を10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用い48穴の培養用プレートで細胞がサブコンフルエントになるまで定法に従いCO₂インキュベーターで培養した。培地を2%ウシ胎児血清を含むDMEMに交換し、SNP (0.5mM)を加えると、16時間後の観察ではすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により観察された。そこで本培養系の培地中に、SNPを加える前に、試験化合物 1 3、1 4、1 7、2 0、2 4または2 5 (各々10 μ M)を加え、24時間後に細胞を観察した。その結果、いずれの化合物を加えた場合にもアポトーシスが完全に抑制され、95%以上の細胞が生存していた。

20

試験例 10

公知の方法(A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System, 211頁, 1989年, Alan R. Liss, Inc.)に従って7日令ラットの小脳より小脳顆粒細胞を分離、培養した。すなわち上記文献記載の分離操作の後、細胞を10%

25

牛胎児血清を含むDMEM培地(25mM KCl, 2mM glutamineを含む)へ再懸濁し、ポリリジンでコートしたプレートにまき、定法に従い48時間CO₂インキュベーターで培養し、シトシン-1-β-D(+)-アラビノフラノシド(Ara-C) (10 μM)を添加してさらに培養を継続した。以下の実験には神経突起の伸長が十分完了している

5 培養開始日より7日目以降14日目までの細胞を用いた。以上のようにして培養した小脳顆粒細胞に、過酸化水素(10 μM)を加えると、12時間後の観察ではすべての細胞が死滅している事が光学顕微鏡により観察された。この培地に過酸化水素添加前に試験化合物 19 (10 μM)または試験化合物 25 (10 μM)を加えた場合には、同じく12時間後の観察で95%以上の細胞が生存していた。さらに過

10 酸化水素の濃度を300 μMに上げた実験を行った結果、試験化合物 18 (10 μM)または試験化合物 19 (10 μM)もしくは試験化合物 20 (10 μM)を加えた場合に、16時間後の観察でそれぞれ約90%、90%、70%の細胞が生存していた。

試験例 1 1

15 試験例 10と同様にして培養した小脳顆粒細胞に、SNP(15 μM)を加えると、12時間後の観察ではすべての細胞が死滅している事が光学顕微鏡により観察された。この培地にSNP添加前に試験化合物 14 (10 μM)、試験化合物 19 (10 μM)、試験化合物 20 (10 μM)、または試験化合物 25 (10 μM)を加えた場合には、同じく12時間後の観察で95%以上の細胞が生存していた。

20

試験例 1 2

新生児核黄疸では体内のビリルビン濃度が異常に高くなることにより、重篤な脳障害をひき起こすことが知られている。これはビリルビンによる神経細胞の障害が原因と考えられるが、実際、試験例 10と同様に培養した小脳顆粒

25 細胞にビリルビン(100 μg/mL)を添加すると、細胞死をおこすことが光学顕微鏡により観察され、18時間後の観察ではすべての細胞は死滅していた。この際、ビリルビン添加前に試験化合物 20 (10 μM)を共存させると同じ18時間後の観

察で、約80%の細胞が生存していた。

試験例 1 3

ヒト血液 (2mL) を遠心分離 (1000rpm, 5min) し、赤血球を含む沈殿をDMEM培地で3回洗浄後、同培地 (15mL) に再懸濁 (約 5×10^8 細胞/mL) した。この懸濁液 10 μ L をとり 10% FCS/DMEM (10mL) を加え、48穴プレートに分注した (500 μ L/well)。この赤血球培養液に過酸化水素 (300 μ M) を加え24時間培養したところ、すべての赤血球が死滅する (へこみのある明るい円形の細胞として観察されていた赤血球が、途中何段階かの形態変化をへて 100%暗いゴーストへと変化する) のが光学顕微鏡で観察された。ここに過酸化水素を加える前に試験化合物 1 4 (30 μ M)、試験化合物 1 8 (10 μ M)、試験化合物 1 9 (20 μ M)、または試験化合物 2 0 (20 μ M) を加えて同様に24時間後に観察したところ、死んでいる (暗いゴーストへと変化した) 赤血球の割合はそれぞれ20%, 20%, 10%, 10%と過酸化水素単独に比べて大きく減少した。

試験例 1 4

公知の方法 (機能細胞の分離と培養、丸善、1987年発行、59頁) に従ってマウス線維芽細胞を分離培養した。すなわちマウス皮膚を除毛クリームで除毛後、ヒビテンで消毒し、皮膚組織を小片に切り出した。この皮膚小片が培養用ディッシュの底から浮き上がらない様にスライドガラスを重しとして沈めたまま10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中で定法に従いCO₂インキュベーターで培養した。線維芽細胞が遊走してきたらスライドガラス及び皮膚片を取り除きさらに培養を続けた。この線維芽細胞にNO発生試薬として知られるSNP (0.5mM) を加えると12時間後の観察でもすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光学顕微鏡並びに電子顕微鏡により観察された。そこで本培養系の培地中に、SNPを加える前に試験化合物 1 4 (5 μ M) または試験化合物 1 8 (2.5 μ M) を加え、細胞を観察した。その結果、いずれも48時間後でもアポトーシ

スが抑制され、95%以上の細胞が生存していた。

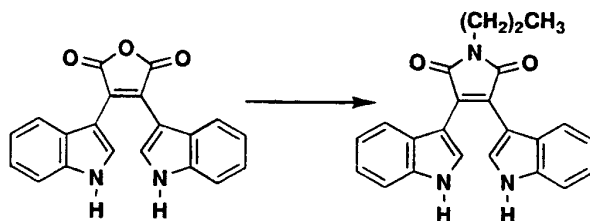
試験例 1 5

マウスより摘出した腎を無血清DMEM培地中で細かくきざみ、トリプシン/EDT
5 A処理により分散させた。静置後上清を捨て沈殿を培養ディッシュに移し10%ウ
シ胎児血清を含むDMEM培地中で定法に従いCO₂インキュベーターで培養した。
組織が付着し、細胞のコロニーが形成されたら組織片を取り除き同じ培地で継
代した。このようにして得られた単層の腎の細胞(形態的に線維芽細胞には似
ていない)にNO発生試薬として知られるSNP (0.5mM)を加えると12時間後の観察
10 でもすべての細胞がアポトーシスに特徴的な形態変化を示して死滅する事が光
学顕微鏡により観察された。そこで本培養系の培地中に、SNPを加える前に試
験化合物 1 4 (5 μM) または試験化合物 1 8 (2.5 μM)を加え、細胞を観察した。
その結果、いずれも48時間後でもアポトーシスが抑制され、95%以上の細胞が
生存していた。

15

参考例 9

20



25

公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)により合成した化合物 1 1 (4
6mg, 0.14mmol)をDMF (8mL)と水(8mL)に溶かした溶液にn-プロピルアミン(0.06m
L, 0.6mmol)を加え、100℃にて1時間攪拌した。減圧濃縮によりDMFを留去し、
濃縮液から酢酸エチルで抽出し、水洗した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥
し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:
n-ヘキサン=1:3)によって精製して、化合物 1 5 (45mg, 87%)を赤色固体として
得た。

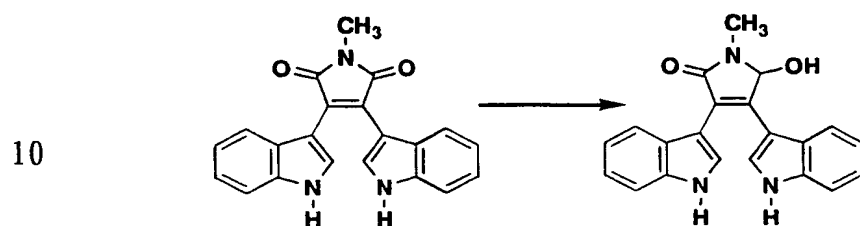
mp 116-119 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 0.97 (t, $J=7.6$ Hz, 3H), 1.71 (tq, $J=7.6, 7.6$ Hz, 2H), 3.61 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 6.58 (m, 2H), 6.77 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 7.23 (m, 2H), 7.65 (s, 2H).

IR (KBr) 3380, 1680, 1530, 1400, 1240, 740 cm^{-1}

5 MS m/z 369 (M^+)

参考例 10



公知の方法 (Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年) により合成した化合物 14 (163mg, 0.477mmol) を THF (10mL) に溶かした溶液に水素化リチウムアルミニウム (27mg, 0.72mmol) を加え、室温にて29時間攪拌した。反応液に水 (8mL) を加え、2N塩酸水溶液により pH2 とした。減圧濃縮により THF を留去し、濃縮液からジクロロメタン、酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン=1:2~5:1) によって精製して、化合物 16 (87mg, 53%) を淡褐色固体として得た。

20 mp > 280°C

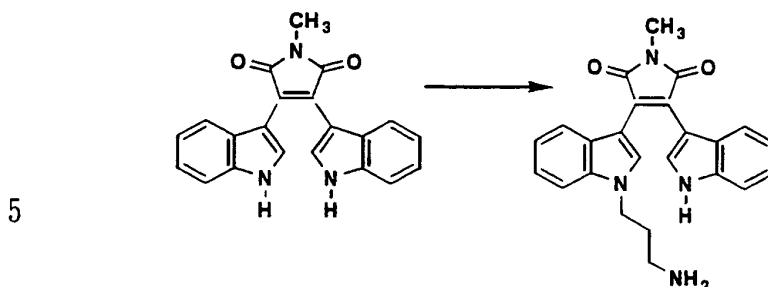
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 3.12 (s, 3H), 5.93 (s, 1H), 6.6-6.7 (m, 2H), 6.9-7.4 (m, 8H).

IR (KBr) 3400, 1660, 1540, 1410, 1240, 1090, 1050, 740 cm^{-1}

MS m/z 343 (M^+)

25

参考例 11



水素化ナトリウム (60~72%油性, 144mg) をペンタンで洗浄後DMF (0.8mL) に懸濁し、そこへ公知の方法 (Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年) に従って合成した化合物 14 (409mg, 1.2mmol) のDMF溶液 (3mL) を加え、室温で45分間攪拌した。

10 一方、3-クロロプロピルアミン塩酸塩 (159mg, 1.2mmol) とペンタンで洗浄した水素化ナトリウム (60~72%油性, 48mg) の混合物に0℃でDMF (2.0mL) を加え5分間攪拌後室温に昇温して静置し、上清を化合物 14 のナトリウム塩の溶液に加え、さらに残渣をDMF (1mL) で抽出しその上清を化合物 14 のナトリウム塩の溶液に加えた。得られた混合物は40℃で1時間攪拌した後、減圧下DMFを留去した。

15 この残渣に塩化メチレンと飽和食塩水を加え、有機層を分取した。水層はさらに塩化メチレンで3回抽出し、得られた有機層を合わせ硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン: イソプロピルアミン=20:1) によって精製して、化合物 19 (296mg, 55%) を暗赤色固体として得た。

20 mp 137-140℃

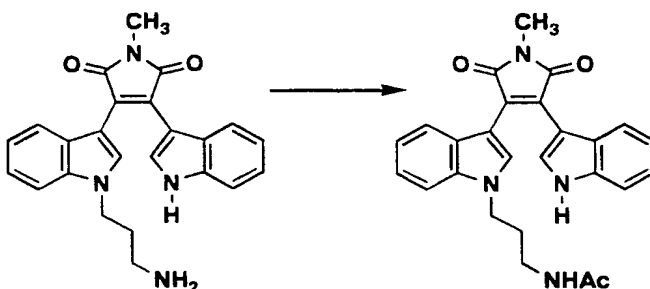
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.81 (tt, $J=6.7, 6.7$ Hz, 2H), 3.05 (s, 3H), 3.1-3.5 (m, 2H), 4.09 (brs, 2H), 4.30 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 6.60 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.67 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.97 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 11.70 (brs, 1H).

IR (KBr) 3350, 2910, 1750, 1680, 1530, 1430, 1380, 740 cm^{-1}

MS m/z 398 (M^+)

参考例 1 2

5



10

化合物 1 9 (4.0mg, 0.01mmol) の塩化メチレン溶液 (300 μ L) にトリエチルアミン (7 μ L, 0.05mmol) 及び無水酢酸 (1.1 μ L) を加え、室温で70分間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加えて塩化メチレンで抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を減圧留去して得られる残留物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン:酢酸エチル=1:1~1:2) で精製する事により、化合物 2 0 (3.2mg, 72%) を暗赤色固体として得た。

mp 86-89 $^{\circ}$ C

15

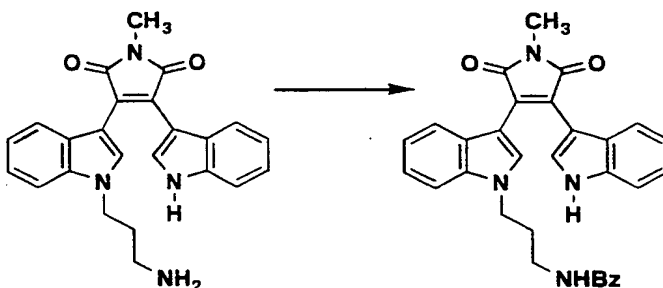
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.86 (s, 3H), 2.05 (tt, $J=6.7, 6.7\text{Hz}$, 2H), 3.14 (dt, $J=6.7, 6.7\text{Hz}$, 2H), 3.19 (s, 3H), 4.19 (t, $J=6.7\text{Hz}$, 2H), 5.40 (brt, $J=6.7\text{Hz}$, 1H), 6.7-6.8 (m, 2H), 6.99 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.0-7.1 (m, 3H), 7.28 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 7.35 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.77 (d, $J=2.7\text{Hz}$, 1H), 8.68 (brs, 1H).

IR (KBr) 3370, 1690, 1530, 1430, 1380, 740 cm^{-1} MS m/z 440 (M^+)

20

参考例 1 3

25



化合物 1 9 (18mg, 0.045mmol) の塩化メチレン溶液 (1mL) にピリジン (18 μ L, 0.

23mmol) 及び塩化ベンゾイル (5.2 μ L, 0.045mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。
。ピリジン (18 μ L, 0.23mmol) 及び塩化ベンゾイル (2.0 μ L, 0.017mmol) を加えさ
らに室温で1時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加えて塩化メチレンで抽出し、
有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を減圧留去して得られる残留物を、シリ
カゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル= 1:1) で精製する事
により、化合物 21 (17.0mg, 75%) を暗赤色固体として得た。

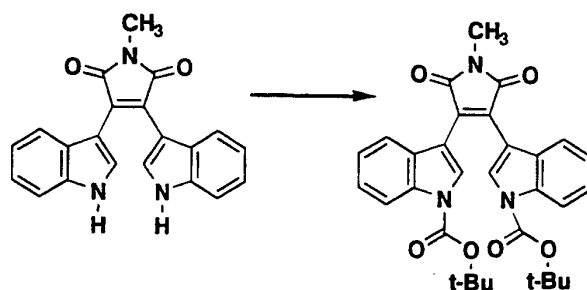
mp 130-133 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.14 (tt, $J=6.6, 6.6\text{Hz}$, 2H), 3.18 (s, 3H), 3.32 (dt, $J=6.6, 6.6\text{Hz}$, 2H), 4.21 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 6.10 (brt, $J=6.6\text{Hz}$, 1H), 6.7-7.8 (m, 15H), 8.71 (brs, 1H).

IR (KBr) 3350, 1750, 1680, 1530, 1420, 1380, 730 cm^{-1}

MS m/z 502 (M^+)

参考例 14



化合物 14 (82mg, 0.24mmol) を THF (5mL) に溶かした溶液に、4°C にてジ-tert-
ブチルジカーボネート (52mg, 0.24mmol) とジメチルアミノピリジン (1.5mg, 0.01
2mmol) を加え、さらに 4°C にて 1 時間、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮
し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1
0~1:1) によって精製して、化合物 23 (62mg, 48%) を黄色固体として得た。

mp 110-113 °C

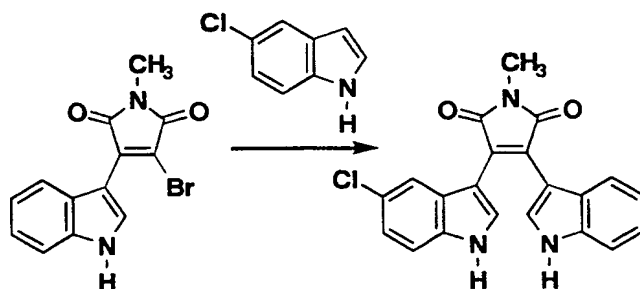
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.68 (s, 18H), 3.22 (s, 3H), 6.8-7.0 (m, 4H), 7.16 (m, 2H), 8.1-8.2 (m, 2H), 8.13 (s, 2H).

IR(KBr) 2960, 1730, 1550, 1440, 1350, 1240, 1140, 1060, 850, 730 cm^{-1}

MS m/z 541 (M^+)

参考例 15

5



10 5-クロロインドール(122mg, 0.805mmol)をトルエン(3mL)に溶かした溶液に、
40℃にて0.96M臭化エチルマグネシウム(0.84mL, 0.81mmol)を加え、40℃にて45
分間攪拌した。引き続き公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)に従っ
て合成した2-ブロモ-3-(1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド(70.1mg,
0.229mmol)をトルエン(9mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下2時間攪拌し
15 た。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(0.5mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮
によりトルエンを留去し、濃縮液からジクロロメタンで抽出した。抽出液を硫
酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマ
トグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:5~1:1)によって精製し、化合物24
(89mg, quant)を淡褐色固体として得た。

20 mp 114-117 °C

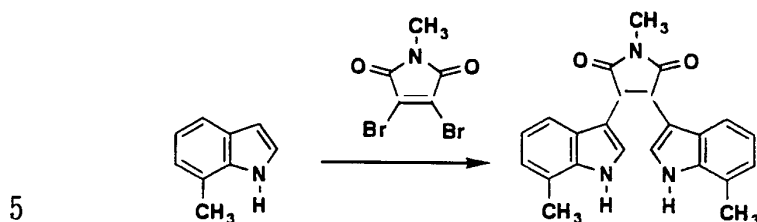
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.20 (s, 3H), 6.6-7.4 (m, 7H), 7.76 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 8.50 (br
s, 1H), 8.60 (brs, 1H).

IR(KBr) 3350, 1680, 1530, 1440, 1370, 730 cm^{-1}

MS m/z 375 (M^+)

25

参考例 16



7-メチルインドール(162mg, 1.23mmol)をトルエン(4mL)に溶かした溶液に、4
 0℃にて0.96M臭化エチルマグネシウム(1.28mL, 1.23mmol)を加え、40℃にて45
 分間攪拌した。引き続き2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(70.4mg, 0.276mmol
)をトルエン(9mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下2時間攪拌した。氷冷下
 10 反応液に20%くえん酸水溶液(0.5mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトル
 エンを留去し、濃縮液からジクロロメタンで抽出した。抽出液を硫酸マグネシ
 ウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー
 (酢酸エチル:n-ヘキサン=1:5~1:1)によって精製し、化合物25(99mg, 97%)
 を赤色固体として得た。

15 mp > 300℃

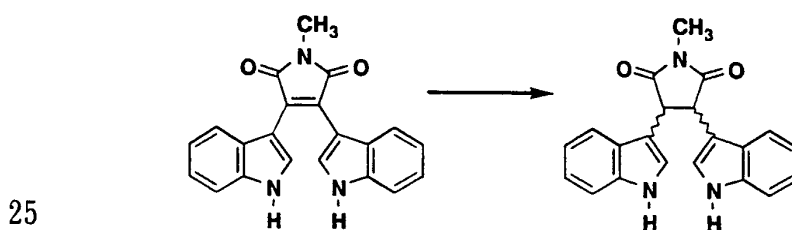
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.48 (s, 6H), 3.21 (s, 3H), 6.6-7.0 (m, 6H), 7.75 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 2H),
 , 8.43 (brs, 2H).

IR (KBr) 3320, 1680, 1530, 1420, 1370, 1110, 800, 750, 670, 590 cm^{-1}

MS m/z 369 (M^+)

20

参考例 17



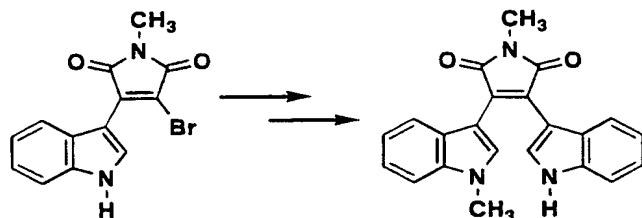
公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)により合成した化合物14(1
 98mg, 0.580mmol)をDMF(10mL)に溶かした溶液に10%パラジウム炭素(40mg)を加

え、水素雰囲気下、室温にて一日攪拌した。パラジウム炭素を濾過により除去し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:10~2:1)によって精製して、化合物30(191mg, 96%)の2つの異性体の混合物(A:B=2.7:1.0)を淡黄色固体として得た。

- 5 A: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.28(s, 3H), 4.77(s, 2H), 6.6-7.4(m, 10H), 7.68(brs, 2H).
 B: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.26(s, 3H), 4.41(s, 2H), 6.6-7.4(m, 10H), 8.15(brs, 2H).
 MS m/z 343(M^+)

参考例18

10



15

公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)により合成した2-ブロモ-3-(1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド(100mg, 0.33mmol)をDMF(5mL)に溶解し、氷冷下炭酸カリウム(140mg, 0.98mmol)およびヨウ化メチル(0.06mL, 0.98mmol)を加え、2時間攪拌した。反応液を室温に戻し、飽和食塩水を加え酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製することにより2-ブロモ-3-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド(99mg, 95.1%)を赤色固体として得た。

20

mp 155-158°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.17(s, 3H), 3.89(s, 3H), 7.16-7.41(m, 4H), 8.05-8.11(m, 1H).
 IR(KBr) 1760, 1700, 1585, 1510, 1430, 1375, 1230, 1150, 1120, 980, 800, 730 cm^{-1}

25

MS m/z 318(M^+)

インドール(66mg, 0.21mmol)をトルエン(1mL)に溶かした溶液に、40°Cにて0.95M臭化エチルマグネシウム(0.5mL, 0.47mmol)を加え、40°Cにて45分間攪拌し

た。引き続き2-ブロモ-3-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド(66mg, 0.21mmol)をトルエン(3mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下2時間攪拌した。氷冷下反応液に20%クエン酸水溶液(1mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製し、化合物35(71mg, 96.8%)を赤色固体として得た。

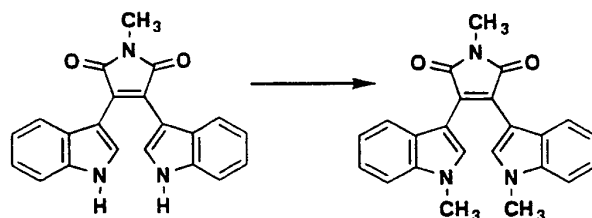
mp 168-171 °C

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 3.05(s, 3H), 3.35(s, 3H), 6.65(t, J=8.0Hz, 2H), 6.75(d, J=8.0Hz, 1H), 6.85(d, J=8.0Hz, 1H), 6.98(t, J=8.0Hz, 1H), 7.03(t, J=8.0Hz, 1H), 7.38(d, J=8.1Hz, 1H), 7.42(d, J=8.1Hz, 1H), 7.74(d, J=2.8Hz, 1H), 7.82(s, 1H), 11.66(b rs, 1H).

IR(KBr) 3450, 1700, 1540, 1440, 1380 cm⁻¹

MS m/z 355(M⁺)

参考例19



公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)により合成した化合物14(50mg, 0.15mmol)をDMF(2mL)に溶解し、氷冷下炭酸カリウム(120mg, 0.88mmol)およびヨウ化メチル(0.05mL, 0.88mmol)を加え、19時間攪拌した。反応液を室温に戻し、飽和食塩水を加え酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製することにより化合物36(54mg, 99.4%)を赤色固体として得た。

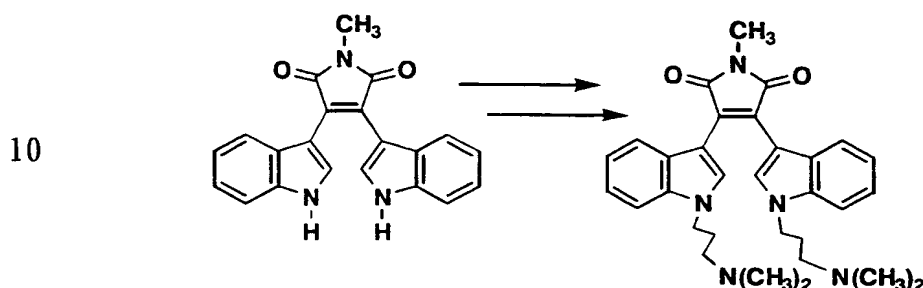
mp > 290°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.17 (s, 3H), 3.82 (s, 6H), 6.72 (t, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 6.91 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.09 (t, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.27 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.67 (s, 2H).

IR (KBr) 3390, 1695, 1530, 1440, 1385, 740 cm^{-1}

5 MS m/z 369 (M^+)

参考例 20



水素化ナトリウム (60~72%油性, 50mg) をペンタンで洗浄後DMF (0.3mL) に懸濁し、そこへ公知の方法 (Tetrahedron, 44巻, 1887頁, 1988年) に従って合成した化合物 14 (150mg, 0.44mmol) のDMF溶液 (1.2mL) を加え、室温で45分間攪拌した。一方、(3-クロロプロピル)ジメチルアミン塩酸塩 (70mg, 0.44mmol) とペンタンで洗浄した水素化ナトリウム (60~75%油性, 18mg) の混合物に0°CでDMF (1.2mL) を加え5分間攪拌後室温に昇温して静置し、上清を2,3-ビス(1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミドのナトリウム塩の溶液に加えた。得られた混合物は40°Cで1時間半攪拌した後、減圧下DMFを留去した。この残渣に塩化メチレンと飽和食塩水を加え、有機層を分取した。水層はさらに塩化メチレンで抽出し、得られた有機層を合わせ硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (飽和アンモニアクロロホルム:メタノール=10:1) によって精製することにより、2-[1-(3-ジメチルアミノプロピル)-1H-インドール-3-イル]-3-(1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド (77mg, 41%) を暗赤色固体として得た。

mp 86-90°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.95 (tt, $J=6.8, 6.8\text{Hz}$, 2H), 2.21 (s, 6H), 2.23 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 3.19 (s, 3H), 4.21 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 6.60–6.82 (m, 2H), 6.95 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.00–7.12 (m, 3H), 7.26–7.35 (m, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.72 (d, $J=2.7\text{Hz}$, 1H), 8.60 (hrs, 1H).
IR (KBr) 3395, 2950, 1700, 1535, 1440, 1390, 750 cm^{-1}

5 MS m/z 426 (M^+)

水素化ナトリウム (60~72%油性, 4.5 mg) をペンタンで洗浄後DMF (0.1mL) に懸濁し、そこへ2-[1-(3-ジメチルアミノプロピル)-1H-インドール-3-イル]-3-(1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド (1.6mg, 0.038mmol) のDMF溶液 (0.5mL) を加え、室温で45分間攪拌した。一方、(3-クロロプロピル)ジメチルアミン塩酸塩 (8.9mg, 0.056mmol) とペンタンで洗浄した水素化ナトリウム (60~75%油性, 2.2mg) の混合物に0°CでDMF (0.5mL) を加え5分間攪拌後室温に昇温して静置し、上清を上記のナトリウム塩の溶液に加えた。得られた混合物は40°Cで1時間半攪拌した後、減圧下DMFを留去した。この残渣に塩化メチレンと飽和食塩水を加え、有機層を分取した。水層はさらに塩化メチレンで抽出し、得られた有機層を合わせ硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (飽和アンモニアクロロホルム:メタノール=10:1) によって精製することにより、化合物37 (4.4mg, 23%) を赤色固体として得た。

10
15

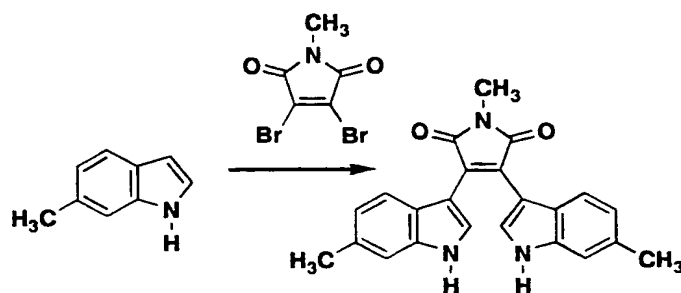
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.97 (tt, $J=6.8, 6.8\text{Hz}$, 4H), 2.20–2.32 (m, 16H), 3.18 (s, 3H), 4.19 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 4H), 6.70 (t, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 6.97 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.12 (t, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.31 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.68 (s, 2H).

20

MS m/z 511 (M^+)

参考例 2 1

5



10

6-メチルインドール(250mg, 2.13mmol)をトルエン(3mL)に溶かした溶液に、40℃にて1.02M臭化エチルマグネシウム(2.1mL, 2.13mmol)を加え、40℃にて45分間攪拌した。引き続き2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(120mg, 0.47mmol)をトルエン(7mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(3mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製し、化合物38(152mg, 87.5%)を赤色固体として得た。

15

mp 139-143 °C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.29 (s, 6H), 3.03 (s, 3H), 6.50 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H), 6.73 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H), 7.16 (s, 2H), 7.64 (d, $J=2.7\text{Hz}$, 2H), 11.49 (brs, 2H).

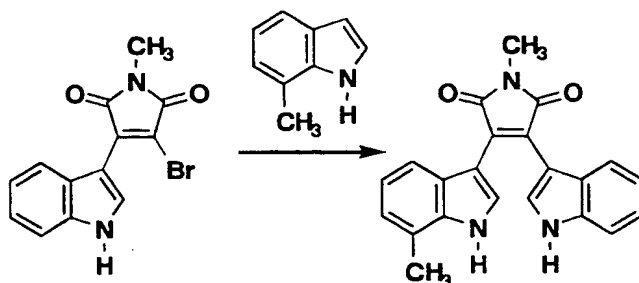
IR(KBr) 3390, 1695, 1535, 1445, 1390 cm^{-1}

20

MS m/z 369 (M^+)

参考例 2 2

25



7-メチルインドール(190mg, 1.63mmol)をトルエン(6mL)に溶かした溶液に、40℃にて1.02M臭化エチルマグネシウム(1.6mL, 1.63mmol)を加え、40℃にて45分間攪拌した。引き続き公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)に従って合成した2-ブロモ-3-(インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド(300mg, 0.74mmol)をトルエン(8mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(3mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:3~2:1)によって精製し、化合物39(220mg, 84.1%)を赤色固体として得た。

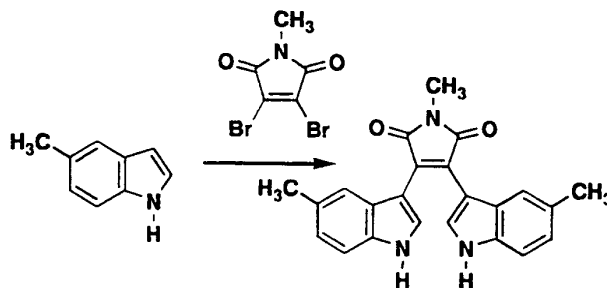
mp 192-195℃

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 2.45 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 6.55 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.65 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.67 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.78 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.88 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.99 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.38 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.72 (d, $J=2.7\text{Hz}$, 1H), 7.74 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 11.65 (brs, 1H), 11.66 (brs, 1H).

IR(KBr) 3390, 1695, 1540, 1440, 1390, 750 cm^{-1}

MS m/z 355 (M^+)

参考例 23



5-メチルインドール(320mg, 2.75mmol)をトルエン(5mL)に溶かした溶液に、40℃にて0.95M臭化エチルマグネシウム(2.8mL, 2.75mmol)を加え、40℃にて45分間攪拌した。引き続き2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(150mg, 0.61mmol)を

トルエン(3mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(3mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製し、化合物40(200mg, 92.1%)を赤色固体として得た。

mp 270-275°C

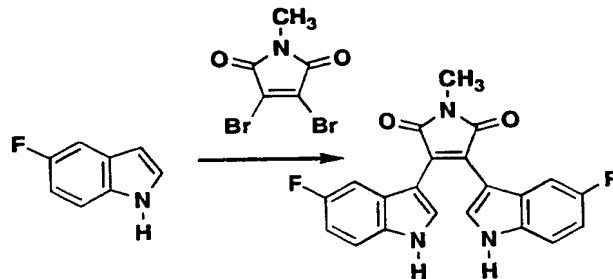
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.06 (s, 6H), 3.20 (s, 3H), 6.73 (s, 2H), 6.90 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J=2.8$ Hz, 2H), 8.42 (brs, 2H).

IR (KBr) 3310, 1690, 1525, 1440, 1390, 1160, 1105, 800 cm^{-1}

MS m/z 369 (M^+)

参考例 24

15



20

5-フルオロインドール(240mg, 1.77mmol)をトルエン(4mL)に溶かした溶液に、40°Cにて1.02M臭化エチルマグネシウム(1.7mL, 1.77mmol)を加え、40°Cにて45分間攪拌した。引き続き2,3-ジブromo-N-メチルマレイミド(100mg, 0.4mmol)をトルエン(6mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(2mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製し、化合物41(125mg, 84.8%)を赤色固体として得た。

25

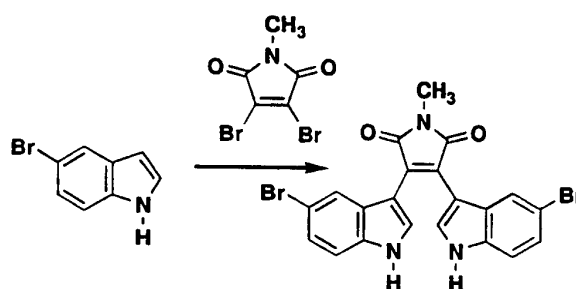
mp > 290 °C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 3.03 (s, 3H), 6.38 (dd, $J=9.0, 2.5\text{Hz}$, 2H), 6.83 (dt, $J=2.5, 9.0\text{Hz}$, 2H), 7.39 (dd, $J=9.0, 4.6\text{Hz}$, 2H), 7.89 (m, 2H), 11.83 (brs, 2H).

IR (KBr) 3440, 3350, 1700, 1530, 1450, 1430 cm^{-1}

MS m/z 377 (M^+)

参考例 25



5-ブロモインドール(690mg, 3.53mmol)をトルエン(6mL)に溶かした溶液に、40°Cにて0.95M臭化エチルマグネシウム(3.7mL, 3.53mmol)を加え、40°Cにて45分間攪拌した。引き続き2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(200mg, 0.78mmol)をトルエン(17mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(6mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製し、化合物42(322mg, 82.2%)を赤色固体として得た。

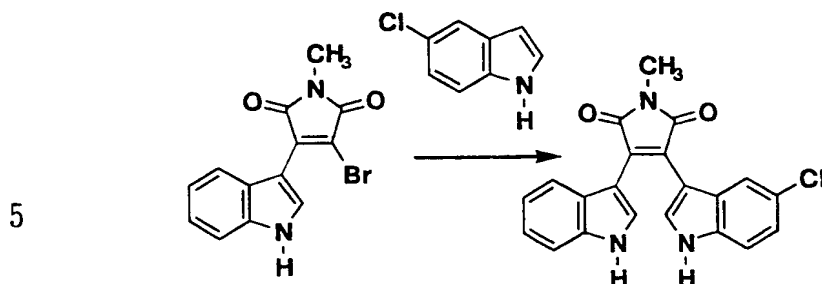
mp > 290°C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 3.05 (s, 3H), 6.86 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 2H), 7.12 (dd, $J=8.6, 1.8\text{Hz}$, 2H), 7.38 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 7.82 (d, $J=2.7\text{Hz}$, 2H), 11.89 (brs, 2H).

IR (KBr) 3380, 1695, 1640, 1540, 1460, 1440, 1395 cm^{-1}

MS m/z 499 (M^+)

参考例 26



5-クロロインドール(122mg, 0.81mmol)をトルエン(3mL)に溶かした溶液に、40℃にて0.96M臭化エチルマグネシウム(0.84mL, 0.81mmol)を加え、40℃にて45分間攪拌した。引き続き、公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)に従って合成した2-ブromo-3-(1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド(70mg, 0.23mmol)をトルエン(9mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下2時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(0.5mL)を加えて攪拌した後減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥したのち、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:5-1:1)によって精製し、化合物43(89mg, 100%)を赤色固体として得た。

10

15

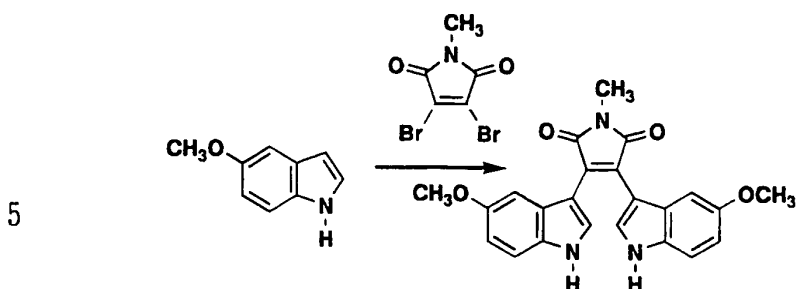
mp 114-117 °C

¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.20 (s, 3H), 6.60-7.40 (m, 7H), 7.70-7.90 (m, 2H), 8.50 (brs, 1H), 8.60 (brs, 1H).

20 IR(KBr) 3350, 1680, 1520, 1440, 1370, 735 cm⁻¹

MS m/z 375 (M⁺)

参考例 27



5-メトキシインドール(520mg, 3.53mmol)をトルエン(8mL)に溶かした溶液に、
 40℃にて0.95M臭化エチルマグネシウム(3.7mL, 3.53mmol)を加え、40℃にて45
 分間攪拌した。引き続き2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(200mg, 0.73mmol)
 10 をトルエン(12mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下
 反応液に20%くえん酸水溶液(2mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエ
 ンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾
 燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸
 エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製し、化合物44(136mg, 86.4%)を赤色固
 15 体として得た。

mp > 290℃

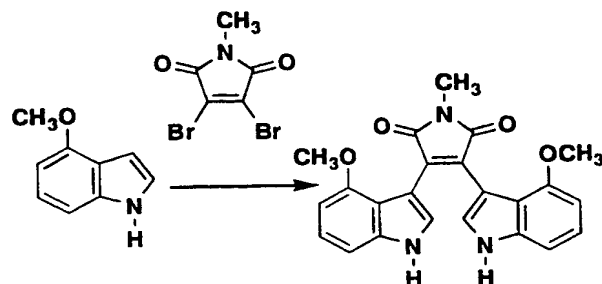
¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 3.03(s, 3H), 3.33(s, 6H), 6.21(d, J=2.3Hz, 2H), 6.55(dd, J=8
 .7, 2.3Hz, 2H), 7.23(d, J=8.7Hz, 2H), 7.77(d, J=2.8Hz, 2H), 11.55(brd, J=2.8Hz, 2
 H).

20 IR(KBr) 3325, 1690, 1530, 1460, 1440, 1220, 1165, 805 cm⁻¹

MS m/z 401 (M⁺)

参考例 28

5



10

4-メトキシインドール(100mg, 0.68mmol)をトルエン(1mL)に溶かした溶液に、
40℃にて0.95M臭化エチルマグネシウム(0.72mL, 0.68mmol)を加え、40℃にて45
分間攪拌した。引き続き2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(40mg, 0.15mmol)を
トルエン(3mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下反応
液に20%くえん酸水溶液(2mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを
留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥し
た後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチ
ル:n-ヘキサン=1:2~2:1)によって精製し、化合物45(57mg, 90.5%)を赤色固
体として得た。

15

mp 182-186 °C

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 3.04(s, 3H), 3.45(s, 6H), 6.37(d, J=7.9Hz, 2H), 6.94(d, J=7.9Hz, 2H), 6.98(t, J=7.9Hz, 2H), 7.25(brs, 2H), 11.31(brs, 2H).

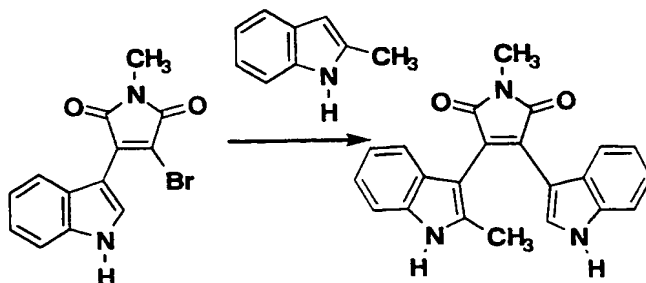
IR(KBr) 3390, 1700, 1440, 735 cm⁻¹

20

MS m/z 401(M⁺)

参考例 29

25



2-メチルインドール(190mg, 1.63mmol)をトルエン(6mL)に溶かした溶液に、40℃にて1.02M臭化エチルマグネシウム(1.6mL, 1.63mmol)を加え、40℃にて45分間攪拌した。引き続き公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)に従って合成した2-ブロモ-3-(1H-インドール-3-イル)-N-メチルマレイミド(300mg, 0.74mmol)をトルエン(8mL)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(3mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりトルエンを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:3~2:1)によって精製し、化合物46(240mg, 91.0%)を赤色固体として得た。

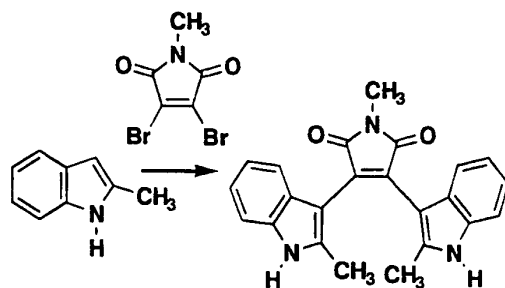
mp 183-186 °C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.91 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 6.47 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.59 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.92 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.03 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.07 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.32 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.35 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.42 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.99 (m, 1H), 11.32 (brs, 1H), 11.80 (brs, 1H).

IR(KBr) 3390, 1695, 1460, 1440, 1392, 740 cm^{-1}

MS m/z 355 (M^+)

参考例 30



2-メチルインドール(1.0g, 8.82mmol)をTHF(10mL)に溶かした溶液に、40℃にて0.95M臭化エチルマグネシウム(9.3mL, 8.82mmol)を加え、40℃にて45分間攪拌した。引き続き2,3-ジブロモ-N-メチルマレイミド(500mg, 1.96mmol)をTHF(4m

l)に溶かした溶液を加え、加熱還流下3時間攪拌した。氷冷下反応液に20%くえん酸水溶液(9mL)を加えて攪拌した後、減圧濃縮によりTHFを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:2)によって精製し、化合物47(452mg, 62.4%)を赤色固体として得た。

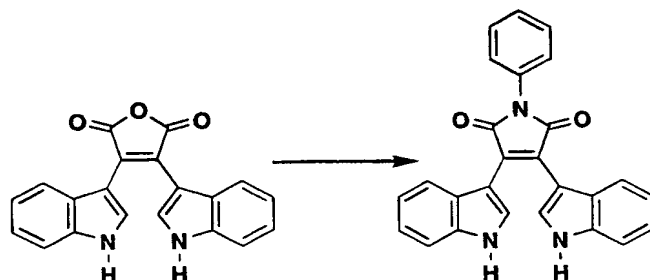
mp > 290°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.06 (s, 6H), 3.22 (s, 3H), 6.92 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.08 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.15-7.24 (m, 4H), 8.04 (brs, 2H).

IR (KBr) 3380, 3310, 1705, 1460, 1440, 1380 cm^{-1}

MS m/z 369 (M^+)

参考例 3 1



公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)に従って合成した化合物11(100mg, 0.3mmol)をDMF(10mL)と水(10mL)に溶かした溶液に、アニリン(0.12mL, 1.2mmol)を加え、100°Cにて2時間攪拌した。減圧濃縮によりDMFを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出し、水洗した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=2:1)によって精製し、化合物48(116mg, 94.4%)を赤色固体として得た。

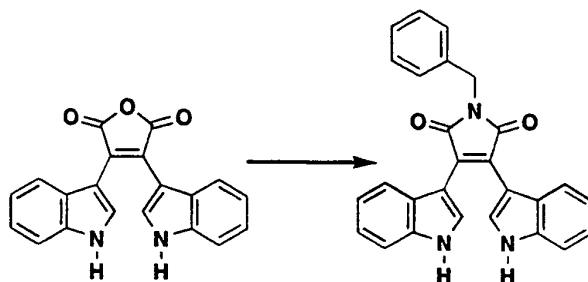
mp > 290°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 6.77 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 7.04 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 7.10 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 7.36 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 7.35-7.45 (m, 1H), 7.48-7.55 (m, 4H), 7.85 (d, $J=2.8\text{Hz}$, 2H), 8.54 (brs, 2H).

IR(KBr) 3365, 1700, 1525, 1430, 1390, 1245, 1120, 740 cm^{-1}

MS m/z 403 (M^+)

参考例 3 2



公知の方法(Tetrahedron, 44巻, 2887頁, 1988年)に従って合成した化合物 1 1 (100mg, 0.3mmol)をDMF(10mL)と水(10mL)に溶かした溶液に、ベンジルアミン(0.13mL, 1.2mmol)を加え、100℃にて2時間攪拌した。減圧濃縮によりDMFを留去し、濃縮液から酢酸エチルで抽出し、水洗した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=2:1)によって精製し、化合物 4 9 (110mg, 86.6%)を赤色固体として得た。

mp > 290℃

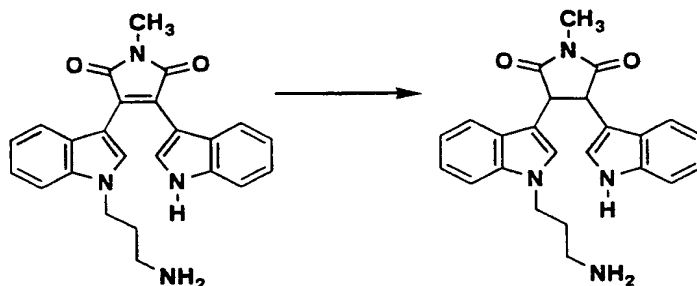
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 4.86 (s, 2H), 6.75 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 6.97 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.06 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.28-7.38 (m, 5H), 7.50 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.7 (d, $J=2.8\text{Hz}$, 2H), 8.49 (brs, 2H).

IR(KBr) 3400, 1695, 1530, 1430, 1405, 750 cm^{-1}

MS m/z 417 (M^+)

参考例 33

5



10

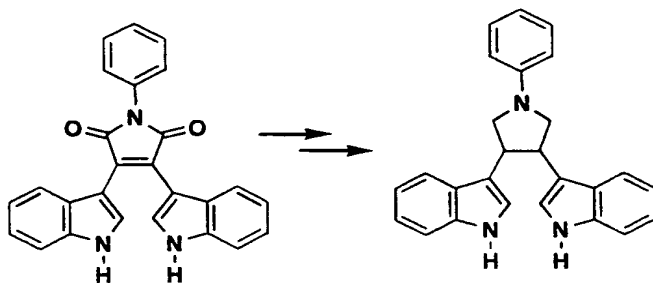
化合物 19 (48mg, 0.12mmol) を DMF (1mL) に溶かした溶液に、少量の 10% パラジウム炭素を加え、水素雰囲気下室温にて 2 日間攪拌した。パラジウム炭素を濾過により除去し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (飽和アンモニアクロロホルム:メタノール=10:1) によって精製し、化合物 33 (32mg, 66.7%) を淡赤色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.42 (brs, 2H), 1.90 (tt, $J=6.8, 6.8\text{Hz}$, 2H), 2.67 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 3.26 (s, 3H), 4.12 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 4.42 (s, 2H), 6.82-7.45 (m, 10H), 8.52 (brs, 1H).

15

参考例 34

20



25

化合物 48 (55mg, 0.14mmol) を DMF (2mL) に溶かした溶液に少量の 10% パラジウム炭素を加え、水素雰囲気下、室温にて一日攪拌した。パラジウム炭素を濾過により除去し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン=2:1) によって精製することにより、3,4-ビス(1H-インドール-3-イル)-1-フェニル-2,5-ジオキソピロリジン (36mg, 56.1%) を淡赤色固体として得た。

mp 260-263°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 4.92 (s, 2H), 6.61-6.70 (m, 2H), 6.87-7.09 (m, 6H), 7.30-7.60 (m, 7H), 7.64 (brs, 2H).

IR (KBr) 3440, 3400, 1700, 1380, 1180, 750 cm^{-1}

5 MS m/z 405 (M^+)

3,4-ビス(1H-インドール-3-イル)-1-フェニル-2,5-ジオキソピロリジン (30mg, 0.07mmol) を THF (1mL) に溶解し、氷冷下 0.94M 水素化ジイソブチルアルミニウム (0.3mL, 0.29mmol) をゆっくりと滴下した。室温にて 4 時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え 30 分間攪拌した。不溶物をセライト濾過により除去し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:1)によって精製することにより、化合物 3 4 (4.4mg, 15.8%) を無色固体として得た。

mp 97-99°C

15 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.74 (dd, J=5.4, 9.0Hz, 2H), 3.92 (dd, J=6.5, 9.0Hz, 2H), 4.13-4.25 (m, 2H), 6.46 (d, J=2.4Hz, 2H), 6.96-6.78 (m, 3H), 6.91 (t, J=8.0Hz, 2H), 7.07 (t, J=8.0Hz, 2H), 7.20 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.26-7.37 (m, 4H), 7.64 (brs, 2H).

IR (KBr) 3410, 1600, 1510, 1480, 1460, 1370, 745 cm^{-1}

MS m/z 377 (M^+)

20 以上の結果から、本発明に係る化合物が様々な刺激によっておこる様々な細胞の細胞死を抑制することが判明した。また、初代培養細胞を用い、種々のアポトーシス刺激による細胞死を顕微鏡や染色法などで調べるアッセイ法により、簡便に細胞死抑制剤を検出できることが判明した。

25 産業上の利用可能性

本発明に係るインドール誘導体は、広汎な細胞死誘発刺激による細胞死を抑制するため、細胞死がその発症および増悪に関与しているすべての疾患の予防

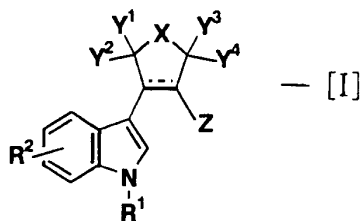
もしくは治療に有用と考えられる。従って、アルツハイマー病、脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、網膜色素変性症、緑内障、小脳変性、新生児核黄疸などの神経変性疾患、筋ジストロフィー、脳卒中等による脳虚血およびその後の遅発性神経細胞死、心筋梗塞等による虚血性心疾患(心筋虚血と再灌流障害)、ウイルス性心筋炎、自己免疫性心筋炎(拡張型心筋症や慢性心筋炎等)、肥大心および不全心にみられる心筋障害/細胞死、不整脈源性右室心筋症、アルコール性肝炎やウイルス性肝炎、糸球体腎炎や溶血性尿毒症症候群等の腎疾患、後天性免疫不全症候群(AIDS)、中毒性表皮壊死融解(TEN)、多形滲出性紅斑などの炎症性皮膚疾患や脱毛症ならびに移植片宿主反応(GVH)、さらには放射線による障害もしくは抗癌剤や抗ウイルス薬などの薬剤による副作用を含む種々の薬物による障害、敗血症、再生不良性貧血などの骨髓異形成症、インスリン依存性糖尿病、クロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病、移植臓器等の機能不全の治療薬またはその進行、増悪を停止もしくは抑制する医薬としての用途、並びに細胞、組織、臓器の保存剤としての用途を有する。また、本発明に係る初代培養細胞を用いるアッセイ系は、細胞死抑制剤の探索に有用と考えられる。

請求の範囲

1. 一般式[I]

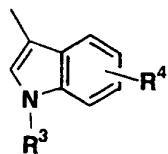
すなわち本発明は、下記一般式[I]

5



(式中、Xは酸素原子またはN-R⁵を表し、Zはハロゲン原子または

10



15

20

25

を表し、R¹, R³はそれぞれ独立に水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオカルボニル基、置換基を有していてもよいアミノカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいアルコキシル基もしくはアリールオキシ基、またはヒドロキシル基を表し、R², R⁴はそれぞれインドール環上の置換基を表し、置換基の数及び置換位置(インドール環の位置番号で2, 4, 5, 6あるいは7位)ならびに置換基の種類はそれぞれ同じでも異なってもよく、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよいアルコキシもしくはアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオカルボニル基、置換基を有していてもよいアミノカルボニル基、置換基を有していても

- よいアルキルもしくはアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいアルコキシル基もしくはアリーロキシ基、置換基を有していてもよいアルキルもしくはアリールチオ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、シアノ基、ニトロ基、置換基を有していてもよいアミノ基、またはハロゲン原子を表し、 R^5 は置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよいアリール基、置換基を有していてもよいアルコキシル基もしくはアリーロキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基、ヒドロキシル基もしくは水素原子を表す。 Y^1 と Y^2 及び Y^3 と Y^4 はそれぞれ独立に、2個の水素原子あるいは水素原子とヒドロキシル基を表すか、または一体となってカルボニル基を表し、また、 R^1 と R^2 、 R^1 と R^3 、 R^3 と R^4 、または R^2 と R^4 は一体となって置換基を有していてもよい炭化水素鎖あるいはヘテロ原子を含む炭化水素鎖を形成していてもよい。式中、破線をともなう結合は二重結合または単結合を表す。)で表されるインドール誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする細胞死抑制剤。
- 15 2. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする、神経変性疾患に対する神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。
- 20 3. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする、新生児核黄疸に対する神経細胞死を抑制することによる予防または治療薬。
- 25 4. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする、筋ジストロフィーに対する細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。
5. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする、脳虚血およびその後の遅発性神経細胞死(DND)に対する、神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。
6. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩

を有効成分とする虚血性心疾患、ウイルス性心筋炎、自己免疫性心筋炎、肥大心もしくは不全心にみられる心筋障害／細胞死、不整脈源性右室心筋症に対する、心筋細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

7. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするアルコール性肝炎もしくはウイルス性肝炎に対する、肝細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

8. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする腎疾患に対する、腎細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

9. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする後天性免疫不全症候群(AIDS)に対する、過剰なT細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

10. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする炎症性皮膚疾患、脱毛症もしくは移植片宿主反応(GVH) に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

11. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする放射線照射による障害もしくは薬物による副作用又は障害に対する、細胞死を抑制することによる障害や副作用の予防もしくは治療薬。

12. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする敗血症に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

13. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする骨髓異形成症に対する、骨髓由来細胞の死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

14. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするインスリン依存性糖尿病に対する、細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

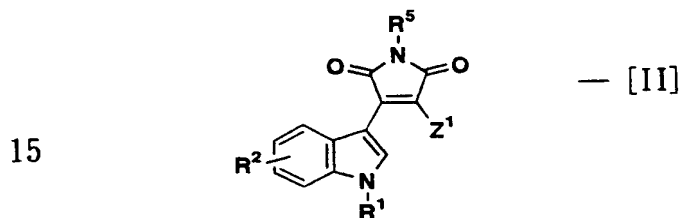
15. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とするプリオン病に対する、神経細胞死を抑制することによる症状の進行の予防または治療薬。

5 16. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分として含有する、臓器、組織または細胞移植時の移植臓器、組織または細胞の機能不全の予防または治療薬。

17. 上記一般式[I]で表される誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分として含有する、臓器、組織または細胞の保存剤。

10 18. 初代培養細胞に、試験化合物の存在下に細胞死誘導刺激を加えるか、もしくは細胞死誘導刺激を加えた直後に試験化合物を加え、細胞の死滅割合を評価することを特徴とする細胞死抑制物質のアッセイ法。

19. 下記一般式[II]



(式中、Z¹はハロゲン原子を表し、R¹、R²とR⁵は前記と同じ意味を表す。)で表される2-ハロ-3-インドリルマレイミド誘導体またはその医薬として許容されうる塩を有効成分とする医薬。

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ A61K31/30 // C07D403/04, 14, 405/04, 14, 471/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ A61K31/30, C07D403/04, 14, 405/04, 14, 471/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA, REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 2-306974, A (Goedecke AG.), 20 December, 1990 (20. 12. 90), Full text & DE, 3914764, A & ZA, 9003409, A & US, 5380746, A & US, 5516915, A	1-7, 9, 10, 15 8, 11-14, 16-19
X	JP, 1-233281, A (F. Hoffmann-La Roche & Co., AG.), 19 September, 1989 (19. 09. 89), Full text & EP, 328026, A & AU, 8929658, A & NO, 8900568, A & DK, 8900558, A & FI, 8900652, A & PT, 89661, A & ZA, 8900865, A & US, 5057614, A & IL, 89167, A & SU, 1799382, A & CZ, 280738, A & SK, 8900752, A	1, 5, 7, 9, 10
X	JP, 7-504673, A (The Wellcome Foundation Ltd.), 25 May, 1995 (25. 05. 95), Full text & WO, 93/18765, A1 & AU, 9337613, A & AU, 9337614, A & EP, 630241, A1 & US, 5547976, A	1, 6, 7, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 April, 1999 (21. 04. 99)Date of mailing of the international search report
11 May, 1999 (11. 05. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/00772

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 7-304771, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 21 November, 1995 (21. 11. 95), Full text & EP, 675125, A1 & CA, 2144940, A & US, 5629304, A	1, 16
X	WO, 97/04761, A1 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY), 13 February, 1997 (13. 02. 97), Full text & AU, 9667143, A	1, 8, 11, 17
X	WO, 92/17193, A1 (INSTITUT PASTEUR), 15 October, 1992 (15. 10. 92), Abstract & FR, 2674433 & EP, 599845, A1	18
X	ZHU Wen-Hui et al., "Differential effects of phorbol ester on apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells", Biochem. Pharmacol., (1996), 51(9), pp.927-36	18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/00772

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The group of inventions as set forth in claims 1 to 17 and 19 relates to medicinal compositions characterized by containing indolylmaleimide derivatives, while the invention as set forth in claim 18 relates an assay method not restricted to indolylmaleimide derivatives. These groups of inventions do not have a technical feature in common. Such being the case, two groups of inventions are described in claims 1 to 7 and 19 and 18.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



7

8

9

10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ A 61 K 31/30//

C 07 D 403/04, 14, 405/04, 14, 471/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ A 61 K 31/30, C 07 D 403/04, 14, 405/04, 14, 471/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA, REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 2-306974, A (ゲデツテ・アクチエンゲゼルシャフト), 20. 12月. 1990 (20. 12. 90), 全文&	1-7, 9,
A	DE, 3914764, A&ZA, 9003409, A&	10, 15
	US, 5380746, A&US, 5516915, A	8,
		11-14,
		16-19
X	J P, 1-233281, A (エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・ウント・コンパニー・アクチエンゲゼルシャフト), 19. 9月. 1989 (19. 09. 89), 全文&EP, 328026, A&	1, 5, 7,
	AU, 8929658, A&NO, 8900568, A&	9, 10
	DK, 8900558, A&FI, 8900652, A&	
	PT, 89661, A&ZA, 8900865, A&	

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保

4 P

9159

電話番号 03-3581-1101 内線 6606

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	US, 5057614, A&IL, 89167, A&SU, 1799382, A&CZ, 280738, A&SK, 8900752, A	
X	JP, 7-504673, A (ザ・ウェルカム・ファウンデーション・リミテッド), 25. 5月. 1995 (25. 05. 95), 全文&WO, 93/18765, A1&AU, 9337613, A&AU, 9337614, A&EP, 630241, A1&US, 5547976, A	1, 6, 7, 9
X	JP, 7-304771, A (協和醗酵工業株式会社), 21. 1月. 1995 (21. 11. 95), 全文&EP, 675125, A1&CA, 2144940, A&US, 5629304, A	1, 16
X	WO, 97/04761, A1 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY), 13. 2月. 1997 (17. 02. 97), 全文&AU, 9667143, A	1, 8, 11, 17
X	WO, 92/17193, A1 (INSTITUT PASTEUR), 15. 10月. 1992 (15. 10. 92), アブストラクト&FR, 2674433, EP, 599845, A1	18
X	ZHU Wen-Hui et al., "Differential effects of phorbol ester on apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells", Biochem. Pharmacol., (1996), 51(9), pp. 1229-36	18